



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

“CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA PARAOXONASE SÉRICA TIPO 1 EM
ONCOLOGIA CANINA”

FILIPA LIMA INÁCIO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva

Moreira

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São

Braz

ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes

Ferreira São Braz

COORDINADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2015
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

“CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA PARAOXONASE SÉRICA TIPO 1 EM
ONCOLOGIA CANINA”

FILIPA LIMA INÁCIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva
Moreira

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

COORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2015
LISBOA

Aos meus pais.

Agradecimentos

A toda a equipa do Hospital de Pequenos Animais da faculdade de medicina veterinária de Leipzig, Alemanha, em especial ao diretor da clínica e a toda a equipa de cirurgia:

- Professor Doutor Gerhard Oechtering;
- Dr. Ângelo Alessandro Andreoni;
- Dra. Amalia Bolia.

A todos os auxiliares, enfermeiros, médicos veterinários e professores do hospital escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, em especial ao Dr. Gonçalo Vicente, pelo empenho e dedicação na orientação do meu estágio curricular.

À minha orientadora, a professora Doutora Berta São Braz, por ter aceite orientar esta dissertação, por toda a atenção, paciência, carinho e conhecimento que dedicou ao longo deste período.

Ao Dr. Telmo Nunes pela disponibilidade em ajudar na construção desta dissertação.

Ao laboratório de anatomia patológica da FMV-ULisboa, pela disponibilização das imagens.

À minha família. Destacando os meus queridos pais, Jorge Inácio e Fátima Lima, sempre presentes, pelos exemplos de pessoa que são, pelo apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim.

Aos meus amigos que são a minha segunda família, sempre presentes.

Agradeço a todos os meus animais, especialmente à Cockie, ao Pasha e ao Zico, por todo o amor.

Resumo

A iniciação e a progressão neoplásica têm sido relacionadas com o stress oxidativo, o qual atua como agente de lesão genética, aumentando as mutações e levando à indução de lesão do ADN (ácido desoxirribonucleico), à instabilidade do genoma, à proliferação celular, ao aumento da sobrevivência e da migração celular. A existência de neoplasia está também associada a baixas concentrações de antioxidantes no sangue. A paraoxonase sérica tipo 1 (PON1) pertence à família das proteínas de fase aguda rápida negativa com propriedades antioxidantes e por isso relacionada com doenças que envolvem o stress oxidativo e, consequentemente, com doenças neoplásicas.

O presente estudo teve como objetivo a determinação do valor prognóstico da variação da atividade da PON1 em oncologia canina.

Assim, foi avaliado o valor da atividade da PON1 em 48 cães, metade pertencente ao grupo controlo e os restantes ao grupo de doentes oncológicos. Entre estes foram estudados oito cães com linfoma e dezasseis com mastocitoma.

Foi realizada a comparação do valor da atividade da PON1 entre os diferentes grupos de animais estudados, foram avaliadas as variações de PON1 de acordo com a idade, género e algumas alterações encontradas nos parâmetros de estado geral dos doentes oncológicos e foi estudada a função de sobrevivência.

Os resultados revelaram uma diminuição dos valores da atividade da PON1 nos doentes oncológicos, variação esta mais acentuada nos animais com linfoma. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre géneros e entre os animais com menos e com 10 anos ou mais. Já os animais com sinais gastrointestinais e com alterações no hemograma revelaram diferenças significativas nos valores de atividade da PON1. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na atividade da PON1 na sobrevida dos animais com doença oncológica.

Face aos resultados obtidos pode concluir-se que, embora existam diversos fatores de prognóstico, a análise da atividade da PON1 é vantajosa nos animais que apresentam linfoma e por este facto constituir uma ajuda valiosa para os clínicos na decisão da terapêutica a aplicar e para os proprietários quanto à abordagem ao seu animal.

Palavras – chave: stress oxidativo, paraoxonase sérica tipo 1, prognóstico, linfoma e mastocitoma.

Abstract

Neoplastic initiation and progression has been related with oxidative stress, since it acts as a genetic lesion agent, increasing mutations and leading to DNA (deoxyribonucleic acid) damage, genome instability, cellular proliferation, increased survival and cell migration. Low concentrations of essential antioxidants are observed in the bloodstream, associated with the oncologic disease. Paraoxonase 1 (PON1) is a fast negative acute phase protein with antioxidant properties, thereby it is related to several diseases involving oxidative stress, and therefore with neoplastic diseases.

The present study aimed to determinate the prognosis value of the PON1 activity variation in canine oncology.

The sample studied consisted in 48 dogs, half of which belonged to the control group and the remaining were oncologic patients: eight with lymphoma and sixteen with mast cell tumour, in which the value of PON1 activity was measured.

In this study the value of PON1 activity of the different groups was compared, as well as the PON1 activity variations according with age, gender and some changes in the general health parameters of the oncologic patients and the survival function was studied.

The results revealed a decrease in PON1 value in the oncologic patients, which was more pronounced in the lymphoma patients. No significant differences were found regarding gender and age. Only the dogs with gastrointestinal signs and with blood cell count changes revealed some statistical differences. Significant differences were observed in survival between animals with “Higher” and “Lower” PON1 activity values.

Considering our results, and although there are several prognostic factors in these tumours, it can be concluded that PON1 activity analysis maybe usefull and can help the owners with their decisions concerning the therapeutic approach of their pet.

Key-words: oxidative stress, paraoxonase 1, prognosis, lymphoma and mast cell tumour.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice Geral	v
Índice de Figuras	ix
Índice de Gráficos.....	ix
Índice de Tabelas	ix
Índice de Siglas e Abreviaturas	x
Capítulo I – Relatório de Estágio	1
Capítulo II – Revisão bibliográfica	3
1. Introdução.....	3
2. Stress Oxidativo.....	5
2.1. Radicais livres e ROS	5
2.2. Antioxidantes	6
2.3. Fatores que induzem stress oxidativo	8
2.4. Influência da idade no stress oxidativo.....	9
2.5. Alvos biológicos e tipos de lesões provocadas pelo stress oxidativo	9
2.6. Métodos de determinação do stress oxidativo	10
2.7. Relação entre a carcinogénese e os ROS	10
2.8. Alterações dos níveis de stress oxidativo nas neoplasias	12
2.9. Os ROS, a inflamação e o desenvolvimento de neoplasias	12
2.10. O stress oxidativo e os doentes oncológicos em Medicina Veterinária.....	13
2.11. Suplementação dos doentes oncológicos com antioxidantes.....	14
3. Paraoxonase sérica tipo 1 (PON1).....	16
3.1. Avaliação da atividade da PON1	17
3.1.1. Fatores que interferem na avaliação da atividade da PON1.....	17
3.2. Estudos da atividade da PON1 em Medicina Veterinária.....	18
4. Linfoma	21
4.1. Etiologia e Epidemiologia	21
4.2. Classificação	22
4.2.1. Classificação anatómica	22
4.2.2. Classificação Histológica	22
4.2.3. Classificação do Imunofenótipo.....	23
4.3. Proliferação Celular dos Linfomas	23
4.4. Sinais clínicos	24

4.5. Síndrome paraneoplásica do Linfoma	25
4.6. Diagnósticos Diferenciais (DD)	26
4.7. Diagnóstico.....	26
4.7.1. Exame físico	26
4.7.2. Hematologia, Bioquímica sérica e Urianálise	27
4.7.3. Imagiologia	28
4.7.4. Citologia e Histologia	28
4.7.5. Imunofenotipagem	30
4.8. Sistema de estadiamento Tumor, Nódulos e Metástases (TNM)	32
4.9. Tratamento.....	32
4.9.1. Cirurgia	32
4.9.2. Radioterapia	32
4.9.3. Quimioterapia	33
4.9.3.1. Protocolo CHOP	33
4.9.3.2. Protocolo fundamentado em COP	35
4.9.3.3. Corticosteróides	35
4.9.3.4. Doxorrubicina	35
4.9.4. Complicações da quimioterapia.....	36
4.9.5. Recorrência do linfoma e a reintrodução do tratamento ou tratamento de resgate	36
4.10. Futuras modalidades de tratamento	37
4.11. Alimentação.....	37
4.12. Prognóstico.....	38
5. Mastocitoma.....	40
5.1. Etiologia	40
5.2. Comportamento Biológico	41
5.3. Apresentação clínica.....	41
5.4. Síndromes Paraneoplásicas	43
5.5. Diagnóstico.....	44
5.5.1. Hemograma.....	44
5.5.2. Radiografia e Ecografia	44
5.5.3. Citologia	44
5.5.4. Histopatologia.....	45
5.6. Tratamento.....	47
5.6.1. Cirurgia	47
5.6.2. Crioterapia	48
5.6.3. Radioterapia.....	48

5.6.4. Quimioterapia.....	49
5.6.4.1. Prednisolona.....	49
5.6.4.2. Vimblastina e prednisolona.....	50
5.6.4.3. Lomustina.....	50
5.6.5. Tratamento intralesional.....	50
5.6.6. Inibidores da tirosina cinase (TKI).....	51
5.6.7. Eletroquimioterapia.....	52
5.6.8. Reovírus oncolítico	52
5.6.9. Tratamento local com interleucina 2 (IL-2)	52
5.7. Reavaliação após remissão total	53
5.8. Prognóstico	53
Capítulo III - Trabalho Experimental	55
1. Introdução.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Material.....	56
2.1.1. Animais	56
2.1.2. Reagentes e outro material	57
2.2. Métodos	57
2.2.1. Diagnóstico e estadiamento das neoplasias.....	57
2.2.2. Colheita e armazenamento de amostras biológicas.....	57
2.2.3. Doseamento da atividade da PON 1	57
2.2.4. Exames Complementares	58
2.2.5. Estado clínico	58
2.2.6. Parâmetros em estudo.....	58
2.2.7. Análise estatística dos dados	59
3. Resultados.....	60
3.1. Caracterização do grupo de doentes oncológicos e do grupo controlo.....	60
3.2. Valores de PON1 nos diferentes grupos	61
3.3. Valores de PON1 nos doentes oncológicos em função de diversos factores.....	63
3.3.1. Idade	63
3.3.2. Género	63
3.3.3. Alterações do estado geral dos doentes oncológicos	64
3.4. Identificação dos valores de “Cut-off” da atividade da PON1	65
3.5. Avaliação do tempo de sobrevivência e do valor prognóstico de PON1.....	66
4. Discussão.....	67
5. Conclusão	74

Capítulo IV - Bibliografía.....	76
Capítulo V - Anexos	82

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura da PON1 (Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/PON1).....	16
Figura 2: Microfotografia de esfregaço de linfoma (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).	29
Figura 3: Microfotografia da lâmina do exame histopatológico de linfoma (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).	29
Figura 4: Microfotografia da lâmina de imunohistoquímica, A) para o anticorpo anti-CD79 (DAKO, clone HM57) e B) para o anticorpo anti-PAX (NOVOCASTRA) (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).	30
Figura 5: Microfotografia da lâmina de imunohistoquímica para o anticorpo anti-CD3 (DAKO) (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).	31
Figura 6: Microfotografia da lâmina de imunocitoquímica para o anticorpo anti-PAX5 (NOVOCASTRA) (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).	31
Figura 7: Microfotografia de esfregaço de mastocitoma (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).	45

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição dos valores dos três grupos estudados.	62
Gráfico 2: Valor da PON1 em animais com mais de 10 anos e em animais com 10 anos ou menos.	63
Gráfico 3: Valores da PON1 em fêmeas e em machos.	63
Gráfico 4: Curva ROC entre o grupo de doentes oncológicos e o grupo de controlo.	66
Gráfico 5: Curva ROC entre o grupo de doentes com linfoma e o grupo de controlo.	66
Gráfico 6 – Função de sobrevivência para o grupo de PON1 “Alto” e para o grupo de PON1 “Baixo”.	67

Índice de Tabelas

Tabela 1: Causas endógenas e exógenas no desenvolvimento de stress oxidativo (Kohen & Nyska, 2002; Uttara, 2009; Adly, 2010; Klaunig <i>et al</i> , 2010).	8
Tabela 2: Classificação anatômica do linfoma.	22
Tabela 3: Estadiamento de cães com linfoma da OMS (Adaptado de Thamm, 2011).	32
Tabela 4: Protocolo CHOP para o linfoma canino (Adaptado de Vail & Young, 2007).	34
Tabela 5: Protocolo COP dose alta para indução de remissão (Adaptado de Albertus, 2012).	35
Tabela 6: Classificação do grau clínico dos mastocitomas caninos segundo a OMS (García, 2012).	41
Tabela 7: Graus histológicos de malignidade, designados como Sistema de Patnaik (Adaptado de García, 2012).	46
Tabela 8: Novo sistema de classificação para avaliação microscópica de metástases nos linfonodos em cães com mastocitoma (Adaptada de Weishaar <i>et al</i> , 2014).	47
Tabela 9: Protocolo da combinação de vimblastina e prednisolona (North & Banks, 2009).	50
Tabela 10: Características do grupo de doentes oncológicos e do grupo controlo.	60
Tabela 11: Estatística descritiva dos três grupos estudados.	62
Tabela 12: Comparação dos valores de PON1 entre os grupos estudados.	62
Tabela 13: Análise estatística dos valores de atividade da PON1 apresentados pelos animais com e sem alterações no trato gastrointestinal, no hemograma, nas análises bioquímicas, nas radiografias torácicas e na ecografia abdominal.	65
Tabela 14: Valor do PON1 dos animais do grupo estudado.	82
Tabela 15: Valor do PON1 dos animais do grupo controlo.	83
Tabela 16: Hemograma e análises bioquímicas dos doentes oncológicos.	84
Tabela 17: Exames complementares imagiológicos dos doentes oncológicos.	86

Índice de Siglas e Abreviaturas

ADA - Adenosina desaminase	iNOS – Sintase do monóxido de azoto
ADN - Ácido desoxirribonucleico	IQR – Intervalo interquartil
AgNORs - Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas	IV - Intravenoso
Ahr - Recetor aril hidrocarboneto	JNK - Cinase c-Jun N-terminal
ALT - Alanina aminotransferase	Kg - Quilogramas
apo A1 - Apolipoproteína A1	LDL - lipoproteínas de baixa densidade
AP-1 – Proteína ativadora-1	LMWA - Antioxidantes de baixo peso molecular
ASC - Área de superfície corporal	MAP - Proteína de ativação de mitógeno
A:T - Adenina: timina	MDA - Malondialdeído
BID – Duas vezes ao dia	MDR-1 - Multirresistência a fármacos
BrdU – 5-bromo-2'-deoxiuridina	mg/cm – Miligramas por centímetro
CaCl ₂ – Cloreto de cálcio	mg/dl – Miligramas por decilitros
CAMV - Centro de atendimento médico veterinário	mg/kg – Miligramas por quilograma
CAT – Catalase	mg/m ² – Miligramas por metro quadrado
CHOP - Ciclofosfamina (C), doxorrubicina (H – hidroxidaunorubicina), vincristina (O – oncovin) e prednisolona (P)	ml - Mililitro
COP - Clorambucil, vincristina e prednisolona	mM - Micromol
COX-2 - Ciclooxigenase –2	Mn-SOD - Superóxido dismutase manganês
Cu-SOD - Superóxido dismutase cobre	MOPP - Vincristina, procarbazona e prednisolona
C:C – Citosina:citosina	NAC - N-acetilcisteína
DD – Diagnósticos diferenciais	NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
DP – Desvio padrão	NF-κB – Fator nuclear kappa B
EC-SOD - Superóxido dismutase extracelular	Ni-SOD - Superóxido dismutase níquel
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético	OCl – Hipoclorito
FAS - Fosfatase alcalina sérica	OH· - Radical hidroxilo
g- Força Gravitacional	OMS - Organização Mundial de Saúde
GPX - Glutathione peroxidase	NO – Monóxido de azoto ou Óxido nítrico
GSH - Glutathione reductase	ONOO ⁻ - Peroxinitrito
GSSG - Glutathione oxidada	ONOOH - Forma protonada do peroxinitrito
GST - Glutathione S-Transferase	ORAC - Capacidade de absorção do radical oxigénio
GST-pi – Glutathione S-transferase gene pi	O ₂ - Oxigénio
Gy - Gray	O ₂ ⁻ - Ânion superóxido
G:C – Guanina:citosina	O ₃ - Ozono
g/L – gramas por litro	PAAF - Punção aspirativa por agulha fina
HCl – Ácido clorídrico	PCNAs - Antigénio de proliferação nuclear celular
HClO - Ácido hipocloroso	PCR - Análise de clonalidade por reação em cadeia da polimerase
HDL - Lipoproteínas de alta densidade	PO – <i>per os</i>
HE-FMV – Hospital escolar da Faculdade de Medicina Veterinária	PON - Paraoxonase sérica
HN – Linfonodo histológico	PPAR- Recetores ativados por proliferador de peroxissoma
Hz - Hertz	PU/PD – Poliúria/Polidipsia
H1 e 2 – Histamina 1 e 2	RO – Radical alcóxido
H ₂ O ₂ - Peróxido de hidrogénio	ROC - Característica de operação do recetor
IL – Interleucina	ROO – Radical peróxido

ROS – Radicais livres de oxigénio
 SID – Uma vez ao dia
 SNC - Sistema nervoso central
 SOD - Superóxido dismutase
 SP1 - Proteína específica 1
 SREBP-2 - Proteínas de ligação a elemento regulador de esterol
 TAC – Capacidade antioxidante total
 TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
 TBBL - Hidrólise da 5-isobutil butirolactona
 TID – Três vezes ao dia
 TKI - Inibidores da tirosina cinase
 TNF- α - Fator de Necrose Tumoral
 TNM - Tumor, nódulos e metástases
 T:A – Timina:adenina
 U/ml – Unidades por mililitro
 UI/cm² – Unidades internacionais por centímetro quadrado
 VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular
 V/cm – Volts por centímetro
 Zn – SOD - Superóxido dismutase zinco
 –SH - Grupos sulfidrilo
 µg/kg – Microgramas por quilograma
 µl – Microlitro
 µmol - Micromol
 °C – Graus centígrados

Capítulo I – Relatório de Estágio

O estágio curricular da autora decorreu no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HE-FMV) da Universidade de Lisboa. Anteriormente a autora teve a oportunidade de realizar um estágio extracurricular no Hospital de Pequenos Animais da Universidade de Leipzig na Alemanha (“Klinik für Kleintiere - Universität Leipzig”), que decorreu entre 2 de Setembro e 15 de Dezembro de 2013. Durante o mesmo, foi-lhe possível estagiar em diferentes áreas, como na cirurgia, na medicina interna, na imagiologia (radiologia, tomografia computadorizada e ecografia), na cardiologia, na oftalmologia e na neurologia. A área em que a autora permaneceu mais tempo, cerca de um mês e meio, foi na área da cirurgia, o que permitiu aprofundar e desenvolver conhecimentos previamente obtidos, ganhar desenvoltura e confiança dentro do ambiente cirúrgico. Em todos os departamentos clínicos era realizada, uma vez por semana, a discussão de artigos científicos no “Journal Club”, aos quais a aluna assistia de acordo com a rotação pelas diferentes áreas. No departamento de cirurgia realizava-se também, semanalmente, o estudo e a discussão de um capítulo do livro “Veterinary Surgery: Small Animal” dos autores Karen Tobias e Spencer Johnston.

O estágio curricular teve lugar no HE-FMV da Universidade de Lisboa, durante 6 meses, entre 3 de Março e 29 de Agosto de 2014. Este estágio incidiu principalmente nas áreas de cirurgia, medicina interna e internamento de pequenos animais, sendo as duas primeiras efetuadas em horários rotativos de 8 horas e o internamento em horários de 12 ou de 24 horas. As atividades realizadas tiveram a supervisão do médico veterinário responsável, enfermeiros ou auxiliares. Na cirurgia a autora acompanhou intervenções de tecidos moles, de ortopedia e de neurologia. Neste serviço e no início de cada turno (entre as 8 e as 9 horas da manhã), os estagiários da cirurgia faziam a receção dos doentes, com o preenchimento da ficha de internamento, pesagem e internamento dos mesmos até ao momento da cirurgia. As tarefas destinadas à aluna estagiária consistiram na preparação e administração de pré-medicação, cateterização de veias periféricas para fluidoterapia, indução de anestesia, colocação de tubo endotraqueal e preparação da área cirúrgica. No decorrer das cirurgias desempenhou funções de circulante, anestesista, ajudante de cirurgião e cirurgiã. Como ajudante de cirurgião procedeu à limpeza da área de intervenção, à tração de tecidos e à realização de suturas intradérmicas e de pele. Como cirurgiã, e sempre com a supervisão e o auxílio do cirurgião responsável, realizou orquiectomias em gatos e cães e, uma ovariohisterectomia de gata.

Na medicina interna as tarefas desempenhadas consistiram na receção e pesagem dos doentes, recolha do estímulo iatotrópico e anamnese e na realização do exame físico. Posteriormente, a aluna apresentava o caso ao clínico e eram discutidos os exames complementares a realizar ou

o tratamento a aplicar, consoante cada caso. No restante tempo de consulta a aluna realizava alguns procedimentos como a administração de vacinas e de medicamentos farmacológicos, a cateterização de veias periféricas para fluidoterapia e a colheita de sangue, urina ou outras amostras biológicas. Nos casos dos doentes urgentes, foi prestado auxílio aos médicos e enfermeiros, através da cateterização de veias periféricas, entubação traqueal, ventilação assistida, compressão cardíaca, toracocentese, abdominocentese, fornecimento de oxigénio e aquecimento dos doentes.

Paralelamente, a autora fez o acompanhamento dos doentes que necessitavam de exames complementares imagiológicos, ajudando os clínicos desta área no posicionamento dos animais e discutindo a interpretação dos resultados.

No internamento, para além de cuidados médicos, a aluna, prestou cuidados paliativos e proporcionou conforto aos animais, preparou e administrou terapêuticas farmacológicas de acordo com a ficha clínica de cada doente, cateterizou veias periféricas, recolheu amostras biológicas (sangue e urina), mediu a glicémia, monitorizou a pressão arterial, avaliou o estado geral de acordo com o parametrizado na ficha clínica e monitorizou transfusões sanguíneas e anestésicas em doentes em *status* epiléticos. A autora realizou ainda outras atividades como mudança de camas, passeio dos cães internados, forneceu alimento e água, bem como conforto e carinho aos doentes críticos.

Assim, a autora concluiu que ao fim de 6 meses acompanhou casos clínicos desde o início até à sua resolução, desenvolveu conhecimentos e capacidade de raciocínio clínico. Tendo o estágio sido, por isso, uma experiência gratificante e enriquecedora tanto a nível profissional como pessoal.

Já este ano, a 31 de Janeiro, a aluna submeteu o resumo (que se encontra em Anexo) do presente trabalho, para o congresso internacional da Sociedade Europeia de Oncologia Veterinária, o qual foi aceite como poster, que irá ser apresentado entre dia 28 e dia 30 de Maio na Polónia em Cracóvia.

Capítulo II – Revisão bibliográfica

1. Introdução

O linfoma e o mastocitoma são neoplasias malignas que podem afetar os nossos animais de companhia e que se encontram entre as mais prevalentes na casuística do Hospital Escolar da FMV, a qual foi utilizada para a realização do trabalho que agora se apresenta.

O linfoma tem origem no tecido hematopoiético devido à proliferação de células linfoides malignas (Vail, 2011) e o mastocitoma ocorre devido ao desenvolvimento anômalo de mastócitos (García, 2012), tendo uma incidência anual de 114/100 000 cães (North & Banks, 2009) e de 90 a 129/100 000 cães (García, 2012), respetivamente.

O prognóstico destas neoplasias depende de diversos fatores. Assim, o prognóstico do linfoma canino varia de acordo com a localização, com a extensão da doença, com a presença de sinais clínicos, com o estadio histopatológico e com o imunofenótipo. Outros fatores a ter em conta no prognóstico desta doença são as multirresistências aos fármacos antineoplásicos, a alteração no processo de morte celular e na proliferação tumoral, bem como a presença de síndromes paraneoplásicas ou de doenças concomitantes e, possivelmente, o género (Vail & Young, 2007). Alguns dos diversos marcadores que podem ser avaliados, permitindo o estabelecimento do prognóstico dos doentes com esta neoplasia são a concentração de alfa 1-glicoproteína ácida, a sobreexpressão das metaloproteínas 2 e 9, os níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a perda da expressão do antígeno B5 e a presença de glicoproteínas P (Albertus, 2012).

No mastocitoma há também diversos fatores que influenciam o prognóstico, tais como o grau de malignidade histológica, a localização e o estadio (García, 2012). Existem ainda marcadores de prognóstico como a taxa de proliferação celular, que pode ser avaliada pela análise da frequência relativa de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs), pela expressão do antígeno de proliferação nuclear celular (PCNAs), pela concentração de Ki-67 e de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009) e pela mutação do c-kit (Marconato *et al*, 2014).

Para a avaliação da maioria destes fatores é necessária a realização de exames complementares adicionais aos doentes oncológicos que implicam demoras e custos adicionais para os proprietários. Importa assim perceber se existem outros marcadores, de realização fácil e rápida, que possam ser utilizados no prognóstico destas neoplasias e que permitam ajudar o médico-veterinário nas suas decisões clínicas.

Os radicais livres de oxigénio (RLO) são produtos do metabolismo celular normal que têm um papel fundamental na estimulação das vias de sinalização das células em resposta a alterações das condições ambientais intra e extracelulares (Reuter, Gupta, Chaturvedi & Aggarwal, 2010). Assim, concentrações baixas de RLO nas células são benéficas e indispensáveis para processos como a transmissão de mensagens intracelulares, a proliferação, a apoptose, a defesa contra microrganismos, a diferenciação e a deteção do crescimento celular. Contudo, quantidades elevadas de RLO quer por excesso de produção quer por remoção celular inadequada, induzem stress oxidativo, o qual produz alterações metabólicas e lesões de macromoléculas biológicas como o ADN, os lípidos e as proteínas (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Plavec *et al*, 2008; Macotpet *et al*, 2013). Estas alterações causam instabilidade dos cromossomas, mutação genética e/ou modulação do crescimento celular que, por sua vez, pode resultar no desenvolvimento de neoplasias (Klaunig, Kamendulis & Hocevar, 2010). A influência de concentrações elevadas de RLO na função celular pode ser difícil de interpretar na presença de neoplasias, uma vez que a transformação maligna e a proliferação de células neoplásicas podem provocar stress oxidativo ou, por outro lado, ocorrer secundariamente a este. No entanto, sabe-se que o stress oxidativo pode aumentar a morbilidade e a mortalidade no Homem com vários tipos de neoplasias, estando também provada a sua importância na eficácia de alguns agentes quimioterápicos e na citotoxicidade mediada pela radiação (Winter *et al*, 2009). Por outro lado, existem também evidências de que concentrações baixas de antioxidantes essenciais na circulação sanguínea estão associada ao aumento da incidência de neoplasias (Stavinohová *et al*, 2012).

A PON1 é uma enzima sintetizada pelo fígado e que pertence à família das proteínas de fase aguda negativa com propriedades antioxidantes (Rossi *et al*, 2014 b) e, como tal, as alterações da sua atividade na circulação sanguínea têm vindo a ser associadas a várias doenças que envolvem stress oxidativo (Tvarijonaviciute, Tecles, Caldin, Tasca & Cerón, 2012).

Considerando as propriedades antioxidantes da PON1, as evidências de uma diminuição de antioxidantes na presença de neoplasias e o facto de não haver conhecimento de estudos que relacionem esta enzima com a doença oncológica em Medicina Veterinária, desenvolveu-se o trabalho agora apresentado, no qual se realizou a avaliação da atividade da PON1 em cães com linfoma e em cães com mastocitoma, visando assim contribuir para o estudo da sua importância como eventual marcador ou fator de prognóstico nestas neoplasias caninas.

2. Stress Oxidativo

Os organismos aeróbios possuem um sistema de defesa capaz de remover os radicais livres de oxigénio (RLO) (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Plavec *et al*, 2008), constantemente produzidas *in vivo* como parte integrante do metabolismo celular (Plavec *et al*, 2008). Os RLO são produtos do metabolismo celular aeróbio, entre as quais se destacam o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o anião superóxido (O_2^-) e os radicais hidroxilo (OH^\cdot) (Aydin, Bulbul, Avci & Celik, 2009; Winter *et al*, 2009).

Em concentrações baixas ou moderadas os RLO podem ser benéficas para a célula estando envolvidas em vários processos fisiológicos, desde processos de sinalização e regulação celular como na transmissão de mensagens intracelulares, na proliferação, na apoptose e na defesa contra microrganismos (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Plavec *et al*, 2008), a processos de diferenciação e deteção do crescimento celular (Plavec *et al*, 2008), participando no controlo da pressão arterial, no desenvolvimento embrionário e na biossíntese de outras moléculas (Kohen & Nyska, 2002).

No entanto, quando o equilíbrio entre a produção dos RLO e as defesas antioxidantes se altera, quer por excessiva produção quer por remoção celular inadequada, ocorre stress oxidativo. Este, por sua vez, induz alterações metabólicas ou lesões de macromoléculas biológicas como os ácidos nucleicos, os lípidos membranares, os glúcidos e as proteínas (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Plavec *et al*, 2008; Macotpet *et al*, 2013). Ocorre então instabilidade dos cromossomas, mutação genética e/ou modulação do crescimento celular (Klaunig *et al*, 2010), o que leva à degeneração, à morte celular (apoptose), à ativação de alguns proto-oncogenes ou à inativação dos genes supressores de tumores (Plavec *et al*, 2008; Macotpet *et al*, 2013). O stress oxidativo agrava várias doenças no Homem, como doenças cardiovasculares, neuropatias, doenças inflamatórias, síndrome de imunodeficiência adquirida, *diabetes mellitus*, doenças renais e neoplasias (Macotpet *et al*, 2013). Também em medicina veterinária o stress oxidativo tem sido documentado em várias situações de doença como na doença cardíaca, no volvo intestinal, na dilatação gástrica, nos linfomas e nos tumores mamários (Winter *et al*, 2009).

2.1. Radicais livres

Os radicais livres podem ser encontrados na natureza, associados a átomos de carbono, enxofre, azoto e oxigénio. Todavia os radicais livres de oxigénio são os que possuem maior relevância biológica pela sua toxicidade e são também os mais prevalentes nos organismos vivos que utilizam o oxigénio como comburente (Kohen & Nyska, 2002).

Os RLO podem ser agrupados em radicais e não radicais. Os radicais são capazes de existência independente e são altamente reativos, podendo reagir entre si para formar uma molécula estável (Kohen & Nyska, 2005; Uttara, 2009). Neste grupo inclui-se o anião superóxido (O_2^-), o peróxido (ROO), o hidroxilo ($OH\cdot$), o alcóxido (RO) e o hidroperóxido. Os não radicais incluem uma grande variedade de substâncias, entre elas o peróxido de hidrogénio, o ácido hipocloroso ($HClO$) e o ácido hipobromoso, o peróxido orgânico, o aldeído, o ozono, o oxigénio singlete e o peroxinitrito (Kohen & Nyska, 2005; Adly, 2010).

O $OH\cdot$ é o radical mais reativo dos sistemas biológicos. Apesar de relativamente estável e constante, é um composto oxidante que pode reagir com o ADN, as proteínas, os lípidos, os aminoácidos, os açúcares e os metais, sendo as suas principais acções a remoção do hidrogénio e a adição e transferência de eletrões (Kohen & Nyska, 2002; Reuter *et al*, 2010).

O H_2O_2 consegue induzir lesão nas células em concentrações relativamente baixas. Os efeitos deletérios que causa podem ser: diretos, quando originados a partir das suas propriedades oxidantes, como a degradação das proteínas heme, a libertação de ferro, a inativação de enzimas, a oxidação de ADN, lípidos, grupos sulfidril ($-SH$) e acetoácidos; e indiretos, através da potenciação outras espécies deletérias, como o $OH\cdot$ e o $HClO$ (Kohen & Nyska, 2002).

Uma das reações mais importantes do monóxido de azoto (NO), sob condições fisiológicas, é resultado da formação de peroxinitrito ($NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$) (Kohen & Nyska, 2002). A forma protonada do peroxinitrito ($ONOOH$) pode causar depleção dos grupos $-SH$ e oxidação de muitas moléculas, podendo causar lesão no ADN, oxidação proteica e a ligação de azoto a resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas (Kohen & Nyska, 2002).

Os RLO produzidos no ciclo ubiquinona do complexo III da cadeia de transporte de eletrões da mitocôndria, regulam a ativação dos fatores induzíveis de hipóxia, provocando à proliferação celular e à angiogénese, sendo estes processos importantes no desenvolvimento e progressão tumoral (Klaunig *et al*, 2010).

2.2. Antioxidantes

Os mamíferos desenvolveram estratégias antioxidantes complexas no interior das células, nas membranas celulares e nos fluídos extracelulares, através da eliminação dos RLO excessivos de forma a impedir a ocorrência de stress oxidativo (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Plavec *et al*, 2008).

Este sistema de antioxidantes naturais pode ser de natureza enzimática ou não enzimática. Os antioxidantes enzimáticos incluem um número limitado de proteínas como a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPH-Px) e a superóxido dismutase (SOD). Já os antioxidantes não

enzimáticos incluem compostos como a glutathione redutase (GSH), o α -tocoferol, o ácido ascórbico, o ácido lipóico, os polifenóis, os carotenóides e os flavenóides (Uttara, 2009).

De acordo com o seu modo de ação, os antioxidantes podem ser “antioxidantes preventivos” que evitam a formação de novos RLO (ceruloplasmina, metalotioneína, albumina, ferritina, transferrina, mioglobina), “antioxidantes de limpeza” que removem os RLO depois de formados, evitando uma reação em cadeia (vitamina E, vitamina C, β -caroteno, ácido úrico, bilirrubina) e “antioxidantes enzimáticos” que catalisam a oxidação de outras moléculas, assegurando a remoção direta dos RLO e conferindo máxima proteção do local biológico, incluindo-se neste grupo a GPH-Px, a GSH, a CAT e a SOD (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Plavec *et al*, 2008).

A SOD converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio que é de seguida transformado em água pela CAT nos lisossomas ou pela GSH-Px nas mitocôndrias (Plavec *et al*, 2008; Klaunig *et al*, 2010). A CAT catalisa a transformação de H_2O_2 em água e em moléculas de oxigénio (O_2), podendo também atuar sobre o metanol, o etanol, o ácido fórmico e os fenóis. A GPX catalisa a redução de vários hidroperóxidos usando, para tal, a GSH (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999 em Plavec *et al*, 2008). A GSH desempenha assim várias funções, uma vez que é um quelante de radicais livres quer por reação direta quer indirecta, é um co-fator de enzimas como a GSH-Px e é ainda utilizada para regenerar outras moléculas antioxidantes como as vitaminas C e E. A GSH é um tripéptido, que se pode apresentar na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), é o principal tampão redox intracelular e atua como cofator da enzima peroxidase e como antioxidante indireto, doando eletrões para a decomposição em H_2O_2 . Esta substância é necessária no metabolismo celular, na comunicação entre células, na prevenção de oxidação dos grupos de proteínas – SH e no transporte de cobre, podendo ainda destoxificar diretamente substâncias carcinogénicas através do metabolismo de fase II (Reuter *et al*, 2010). A superóxido dismutase de Mn (manganês) (SOD-Mn) é induzida seletivamente pelo factor de necrose tumoral (TNF- α) (Plavec *et al*, 2008), sendo encontrada em todos os tumores (Klaunig *et al*, 2010). A superóxido dismutase Cu e Zn (cobre e zinco) (SOD-Cu-Zn) não é essencial à vida, está também presente na carcinogénese, embora se apresente em menor concentração, está relacionada com a fertilidade feminina nos mamíferos e exibe diferenciação nas lesões traumáticas. A SOD extracelular (SOD-EC) encontra-se no espaço intersticial dos tecidos e nos fluídos extracelulares, ocorre primariamente de forma coordenada por citoquinas, não constituindo uma resposta das células aos oxidantes. Já a superóxido dismutase de Ni (níquel) (SOD-Ni) é uma apoenzima com falta de níquel que não tem capacidade para mediar a conversão de um O_2^- para H_2O_2 (Plavec *et al*, 2008).

Os antioxidantes de baixo peso molecular (LMWA) de ação direta doam eletrões ao radical de O_2 , para expulsarem o radical e prevenir o ataque ao alvo biológico. Entre estes encontramos: produtos residuais, como o ácido úrico que pode atuar, por exemplo, com os radicais peróxido, o O_2 e o ozono (O_3); os produtos sintetizados das células, como a carnosina e a homocarnosina (que atuam de várias maneiras para destruir os RLO através da destruição direta dos radicais OH , ROO e RO da ligação ao H_2O_2 , atuam como tampões endógenos e previnem a glicosilação proteica) (Kohen & Nyska, 2002) e a glutatona (Reuter *et al*, 2010); as substâncias obtidas a partir de fontes alimentares, como os tocoferóis (um antioxidante dietético solúvel em lípidos que protege contra a lesão oxidativa devido à inibição da peroxidação lipídica), os carotenos e o ácido ascórbico (Karayannopoulou *et al*, 2013).

Os LMWA podem ser também de ação indireta, como os agentes quelantes, pois podem controlar a produção de RLO endógenos alterando a atividade enzimática, produzindo indiretamente metabolitos de O_2 como a xantina oxidase (Kohen & Nyska, 2002).

2.3. Fatores que induzem stress oxidativo

A ocorrência de stress oxidativo é influenciado por diversos fatores, sendo várias causas exógenas e endógenas (tabela 1).

Tabela 1: Causas endógenas e exógenas no desenvolvimento de stress oxidativo (Kohen & Nyska, 2002; Uttara, 2009; Adly, 2010; Klaunig *et al*, 2010).

Causas exógenas	Causas endógenas
Exposição à radiação γ e ultravioleta.	Neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células mononucleares e linfócitos.
Exposição a ultrassons.	Xantina oxidase e outras enzimas que produzem RLO indiretamente.
Exposição a oxidantes presentes nos alimentos como: peróxidos, aldeídos, ácidos gordos oxidados e metais de transição.	Metabolismo das mitocôndrias, que através da redução da água para a produção de ATP forma vários derivados do oxigénio.
Exposição a fármacos, como a bleomicina e a doxorubicina; a anestésicos voláteis e a fármacos narcóticos.	Algumas doenças que provocam alterações em processos isquémicos.
Fatores dietéticos, como excesso de açúcares, gorduras saturadas, óleos fritos e má nutrição.	Fagocitose de células infetadas por bactérias e vírus, produção de NO , O_2^- , H_2O_2 e hipoclorito (OCl).

Tabela 1 (continuação): Causas endógenas e exógenas no desenvolvimento de stress oxidativo (Kohen & Nyska, 2002; Uttara, 2009; Adly, 2010; Klaunig *et al*, 2010).

Causas exógenas	Causas endógenas
Exposição a xenobióticos entre os quais se incluem toxinas, pesticidas, metais pesados (mercúrio, cádmio e chumbo), poluentes, ozono	H ₂ O ₂ produzido por peroxissomas.
Exposição ao oxigénio singlete.	Sistema enzimático do citocromo P450.
Exposição a bactérias e vírus.	
Exposição a campos electromagnéticos.	
Exercício físico excessivo.	

2.4. Influência da idade no stress oxidativo

O envelhecimento prejudica as funções orgânicas por acumulação de lesões moleculares no ADN, nas proteínas e nos lípidos e também devido a um aumento do stress oxidativo intracelular, uma vez que existe uma diminuição de antioxidantes (Reuter *et al*, 2010). Kohen & Nyska (2002) confirmam um aumento do stress oxidativo em animais mais velhos, baseados na medição total dos LMWA nos tecidos, sendo que neste estudo apenas o tecido cerebral e a pele não apresentaram quaisquer alterações.

2.5. Alvos biológicos e tipos de lesões provocadas pelo stress oxidativo

Os alvos biológicos mais vulneráveis à acção dos RLO são as proteínas, os lípidos e o ADN (Kohen & Nyska, 2002).

A lesão dos lípidos é designada por “peroxidação lipídica”. Os produtos da peroxidação lipídica podem provocar lesão no ADN e, conseqüente, mutagénese e carcinogénese (Karayannopoulou *et al*, 2013). Neste processo, os RLO atuam inicialmente na membrana dos ácidos gordos polinsaturados, alterando a fluidez da membrana celular e as suas características de permeabilidade (Adly, 2010).

A lesão proteica pode ocorrer direta ou indiretamente, provocando lesão de resíduos específicos de aminoácidos, alterações na estrutura terciária, degradação e fragmentação das moléculas proteicas. Estas ocorrências têm como consequência a perda de atividade enzimática, a alteração de funções celulares como a produção energética, as interferências com a criação de potenciais de membrana e as alterações no tipo e nível de proteínas celulares (Kohen & Nyska, 2002).

As lesões no ADN são provocadas pelos radicais de hidroxilo e consistem na modificação das bases de ADN, quebras simples ou duplas, perda de purinas, lesão no açúcar desoxirribose e ligação cruzada de ADN-proteína. Podem ocorrer ainda cortes, mutações nos pares de bases, rearranjos, deleções, inserções e amplificação de sequências (Kohen & Nyska, 2002; Adly, 2010). A lesão oxidativa do ADN pode também ser indireta através do aumento de iões de cálcio intracelular (Adly, 2010). Caso não haja reparação destas lesões antes da replicação do ADN, ocorre replicação dos erros, morte celular e instabilidade genómica (Klaunig *et al*, 2010).

2.6. Métodos de determinação do stress oxidativo

O stress oxidativo pode ser mensurado pelos seguintes métodos: - determinação do estado redox; - quantificação dos radicais livres quer directamente por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrónica, por hidroxilação do ácido salicílico, do ensaio desoxirribose e do ensaio de redução do citocromo c, quer indirectamente através de marcadores imunohistoquímicos para determinação da lesão no ADN, da peroxidação lipídica e da lesão proteica; - quantificação dos marcadores de lesão oxidativa pelos métodos indirectos acima descritos; - quantificação do sistema defensor antioxidante por avaliação das enzimas antioxidantes, através de marcadores imunohistoquímicos e por avaliação da atividade total antioxidante (Kohen & Nyska, 2002).

O stress oxidativo pode ainda ser avaliado pela determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dienos conjugados (Plavec *et al*, 2008). A concentração de TBARS nos tecidos é avaliada por método espectrofotométrico, uma vez que a reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de peroxidação lipídica leva à formação de um cromogéneo corado que pode ser quantificado (Karayannopoulou *et al*, 2013).

2.7. Relação entre a carcinogénese e os RLO

A influência de elevadas concentrações de RLO na função celular pode ser difícil de interpretar na presença de neoplasias, uma vez que a transformação maligna e a proliferação de células neoplásicas podem provocar stress oxidativo ou, por outro lado, ocorrer secundariamente a este (Winter *et al*, 2009).

A relação clara entre a oxidação proteica e a carcinogénese não foi ainda estabelecida (Klaunig *et al*, 2010). Contudo, há evidência da participação dos RLO no desenvolvimento de neoplasias, pois observam-se concentrações baixas de antioxidantes essenciais na circulação sanguínea associadas ao aumento da incidência de neoplasias (Stavinochová *et al*, 2012). A iniciação e a progressão das neoplasias têm sido relacionadas com o stress oxidativo, uma vez que ocorrem devido à indução de lesão do ADN, instabilidade do genoma, proliferação celular, aumento da

sobrevivência e migração celular. Os RLO conseguem ativar algumas vias de sinalização celular contribuindo para o desenvolvimento tumoral através da regulação da proliferação celular, angiogénese e metastização. Por outro lado, os RLO podem também induzir envelhecimento e morte celular e, por isso, funcionar como agente anti carcinogénico (Reuter *et al*, 2010).

Os efeitos mais significativos dos RLO nas vias de sinalização têm sido observados na proteína de ativação de mitógeno (MAP) cinase/AP-1 (proteína ativadora-1) e nas vias do NF- κ B (fator de necrose kappa B) (Reuter *et al*, 2010). O estado redox tem impacto na regulação do NF- κ B, uma vez que regula vários genes envolvidos na transformação celular, na proliferação e na angiogénese. Existe ainda um aumento da expressão de NF- κ B ativado nas células tumorais de neoplasias sanguíneas e de outras neoplasias. O mecanismo pelo qual esta activação ocorre não é claro e a sua relação com o stress oxidativo é complexa. Sabe-se que níveis baixos de stress oxidativo podem levar à ativação do NF- κ B, enquanto um nível elevado de stress oxidativo o pode inibir. Contudo, o NF- κ B pode proteger as células do stress oxidativo pela indução de cadeias pesadas de ferritina e pela regulação dos genes da SOD-Mn. Acredita-se que os RLO sejam um segundo mensageiro da ativação do NF- κ B através do TNF- α e da interleucina-1 (IL-1), pois regulam negativamente a expressão do NF- κ B ativo e inibem a proliferação das células de linfoma e da leucemia mielógena. A importância dos RLO na ativação do NF- κ B é suportada pelo seu bloqueio através de antioxidantes como a L-cisteína, a N-acetilcisteína (NAC), os tióis, os polifenóis do chá verde e a vitamina E (Reuter *et al*, 2010).

Os RLO podem ser produzidos durante a carcinogénese pela acção dos neutrófilos e macrófagos que infiltram o tumor e, pela ativação do sistema imunitário e/ou da necrose tumoral, da hipóxia ou da reperfusão do tecido neoplásico (Karayannopoulou *et al*, 2013).

Em medicina humana e veterinária demonstrou-se o aumento do stress oxidativo nos tecidos tumorais, refletido por uma alteração da atividade das enzimas antioxidantes e por elevadas concentrações séricas dos RLO. Este facto deve-se à desregulação da concentração de antioxidantes, como a libertação de anião superóxido a partir das células tumorais, o que conduz à elevada produção de RLO (Plavec *et al*, 2008).

Nas neoplasias, as baixas concentrações de antioxidantes podem levar à ocorrência de morte celular por necrose e não por apoptose, com inflamação secundária e lesão do tecido circundante, causando exacerbada depleção de antioxidantes e, consequentemente, levando ao desenvolvimento de stress oxidativo (Winter *et al*, 2009).

Vajdovich *et al* (2005) reportaram ainda um aumento da capacidade antioxidante nos linfomas promovendo a atividade antiapoptótica e conduzindo ao desenvolvimento de multirresistência a fármacos.

2.8. Alterações dos níveis de stress oxidativo nas neoplasias

A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima produzida essencialmente por monócitos e macrófagos, fundamental na proliferação e na diferenciação de linfócitos e está relacionada com a produção de RLO, tendo já sido observado um aumento dos seus níveis em oncologia no Homem (Aydin *et al*, 2009).

Existe uma relação entre a concentração de NO e a resposta tumoral, uma vez que este participa na transformação neoplásica inicial. O peroxinitrito é derivado do NO e causa lesão no ADN e peroxidação lipídica (Aydin *et al*, 2009).

A lesão do ADN ocorre através de transversões mutantes nos pares de bases de adenina e citosina de A:T para C:C ou de G:C para T:A. Estas alterações foram reportadas em neoplasias no Homem, como no glioma de alto grau de malignidade, sugerindo o envolvimento do stress oxidativo na progressão tumoral (Kohen & Nyska, 2002).

A cicloxigenase -2 (COX-2) é uma enzima que catalisa a formação de prostaglandinas e de outros eicosanóides a partir do ácido araquidónico, sendo induzida no local da inflamação e estimuladora de agentes pro-inflamatórios, como as IL-1 e o TNF- α . O aumento da síntese (a partir da L-arginina pela ação da sintase do monóxido de azoto (iNOS)) e a libertação de NO nas células inflamatórias aumenta a atividade de COX-2, conduzindo à proliferação celular e à carcinogénese em diferentes órgãos (Kohen & Nyska, 2002).

Existem vários mecanismos de defesa contra a toxicidade provocada por xenobióticos, nomeadamente enzimas metabolizadoras, como a glutathione S-Transferase (GST), e os sistemas antioxidantes, como a glutathione, as vitaminas, a catalase e a superóxido dismutase. A GST codificada pelo gene GST-pi é um membro da família GST da fase II, catalisa reações de destoxificação celular, incluindo a inativação de carcinogénicos eletrofílicos pela sua conjugação com a glutathione. Nos papilomas e carcinomas de células escamosas foi registado o aumento da concentração de GST-pi, indicando irregularidades da indução ou da alteração do fenótipo destas células, comparando-as com as células hiperplásicas (Kohen & Nyska, 2002).

2.9. Os RLO, a inflamação e o desenvolvimento de neoplasias

A relação entre a inflamação e as neoplasias tem sido reportada, uma vez que a administração do tratamento anti-inflamatório se mostra eficaz na prevenção e tratamento de neoplasias. Durante a inflamação, os mastócitos e os leucócitos são recrutados para o local da lesão induzindo expulsão respiratório celular pelo aumento da captação de oxigénio, através do aumento da libertação e da acumulação de RLO no local de lesão celular. As células inflamatórias por si só podem aumentar a lesão do ADN pela ativação dos procarcinogénicos. Os neutrófilos podem ativar aminas aromáticas, aflatoxinas, estrogénios, fenóis e hidrocarbonetos

aromáticos policíclicos por mecanismos dependentes do stress oxidativo. Por outro lado, os neutrófilos e os macrófagos libertam grandes quantidades de SOD, H_2O_2 e OH^\cdot e ativam os seus mecanismos oxidativos (Reuter *et al*, 2010).

O stress oxidativo pode interagir nos três estadios de formação de neoplasias (iniciação, promoção e progressão). No estadio de iniciação interage ao provocar lesão no ADN pela introdução de mutações genéticas e alterações estruturais, no estadio de promoção pela sua contribuição para a expressão genética anormal, para o bloqueio da comunicação entre células e para a modificação dos sistemas secundários de mensagens, resultando num aumento da proliferação celular ou na diminuição da apoptose da população celular de iniciação e no estadio de progressão através da indução de alterações no ADN da população inicial de células (Reuter *et al*, 2010).

2.10. O stress oxidativo e os doentes oncológicos em Medicina Veterinária

No estudo de Vadjovich *et al* (2005), observou-se uma diminuição significativa do valor da atividade da SOD e de GSH em cães com linfoma não Hodgkin's, comparativamente com o grupo controlo, sugerindo assim a ocorrência de stress oxidativo e uma disfunção parcial na atividade antioxidante. No entanto, para outros parâmetros como a GSH, GSSG, MDA (malondialdeído), vitamina C e E, não foram observadas quaisquer alterações significativas. Neste estudo, foi encontrada uma correlação positiva entre o período de remissão dos cães com linfoma após a terapêutica e a taxa de GSH/GSSG nos tecidos tumorais antes do tratamento. O valor total de radicais livres nos tumores apresentou uma correlação positiva com o índice de proliferação dos tecidos, neoplásicos tendo como consequência o aumento da função mitocondrial no curso da oxidação terminal citocromo-dependente e/ou da capacidade antioxidante.

Plavec *et al* (2008) estudaram o estado antioxidante em cães com linfoma multicêntrico, fibrossarcoma oral, mastocitoma, melanoma maligno, osteossarcoma apendicular, tumores nasais e ameloblastoma periférico. Os autores observaram um aumento significativo da atividade da CAT nos doentes oncológicos, sendo de maior expressão nos doentes com tumores nasais. Por seu lado, a atividade da SOD aumentou nos doentes com uma das seguintes neoplasias: melanoma, mastocitoma, linfoma multicêntrico e fibrossarcoma oral. Nos doentes com osteossarcoma e com linfoma multicêntrico verificou-se um aumento da GPh-Px e da TAC (capacidade antioxidante total), respetivamente. O aumento da TAC sugeriu a ativação dos mecanismos de defesa antioxidantes nas diferentes neoplasias.

Aydin *et al* (2009) estudaram o stress oxidativo em cadelas com tumor venéreo transmissível, nas quais se observou um aumento dos níveis de MDA, de vitamina C e ADA e, uma diminuição da atividade antioxidante e do retinol.

Já Winter *et al* (2009) observaram que cães com linfoma multicêntrico de estadio II ou superior, apresentavam níveis da atividade de SOD eritrocitária e concentrações de GPH-Px significativamente menores que os observados nos animais controle. Estes autores concluíram ainda que cães com linfoma não tratado apresentavam concentrações mais baixas de antioxidantes, como o α -tocoferol e o γ -tocoferol, e concentrações mais elevadas da TAC e da peroxidação lipídica, constantando-se assim alterações na interação oxidante-antioxidante. Nos cães que alcançaram remissão completa da neoplasia houve uma alteração significativa na concentração dos biomarcadores das defesas antioxidantes e do stress oxidativo, observando-se um aumento da vitamina E, uma diminuição da vitamina C e a estabilização dos níveis elevados da GPH-Px e do ORAC.

Stavinochová *et al* (2012) estudaram a atividade dos marcadores oxidantes e antioxidantes em cadelas com neoplasia mamária com e sem suplementação de vitamina E. Nas fêmeas com neoplasia suplementadas com vitamina E, verificou-se o aumento do valor dos tióis proteicos após a suplementação. Observou-se também que as fêmeas com neoplasia mamária apresentavam níveis mais elevados de stress oxidativo comparativamente com os animais saudáveis e que a remoção da cadeia mamária e a ovariectomia melhoraram o estatuto oxidativo e antioxidante.

No estudo de Macotpet *et al* (2013) os autores utilizaram 320 cães dos quais 107 tinham diagnóstico de diferentes tipos de neoplasias (adenocarcinoma mamário 34%, mastocitoma 19% e osteossarcoma 10%) e 213 eram clinicamente saudáveis. Neste estudo verificou-se que as concentrações séricas de MDA foram bastante mais elevadas nos doentes oncológicos comparativamente com as observadas nos animais saudáveis. No entanto, não se verificaram diferenças significativas nos valores de MDA entre os animais com diferentes tipos neoplasias (Macotpet *et al*, 2013).

2.11. Suplementação dos doentes oncológicos com antioxidantes

A suplementação com substâncias antioxidantes exógenas diminui o stress oxidativo intracelular e consequentemente o crescimento tumoral e metastático. Este procedimento tem como objetivo auxiliar o tratamento neoplásico através do aumento da função imunitária e da redução dos efeitos secundários dos tratamentos antineoplásicos. Assim, os antioxidantes protegem contra alguns efeitos secundários da radio e da quimioterapia, como alterações gastrointestinais, renais ou cardíacas. Contudo, pode haver efeitos menos benéficos nestas

suplementações, uma vez que a eficácia da radiação e de alguns agentes quimioterápicos dependem do desenvolvimento dos RLO, podendo levar à redução da eficácia do tratamento. Para além destes efeitos menos benéficos, algumas questões relacionadas com a eficácia e a segurança dos produtos antioxidantes tornam a sua suplementação uma questão controversa tanto em medicina humana como veterinária (Freeman, 2009).

3. Paraoxonase sérica tipo 1 (PON1)

A família das paraoxonases é constituída por três enzimas, a PON1, a PON2 e a PON3, que desempenham múltiplas funções, incluindo a proteção contra o stress oxidativo e contra a peroxidação lipídica, a contribuição para a imunidade congénita, a destoxicação de moléculas reativas, a bioativação de fármacos, a regulação da proliferação celular e a hidrólise de organofosforados. Assim, como estas enzimas são capazes de realizar funções não relacionadas entre si, são apelidadas de “proteínas clandestinas” (Cerón, Tecles & Tvarijonaviciute, 2014). A PON1 é uma enzima que se encontra no sangue associada às lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Rossi *et al*, 2014 b). Nos cães, é codificada no cromossoma 14, tendo 9 exões quase todos do mesmo comprimento (NCBI, 2015) mas, pouco se sabe da sua expressão (Bahar, Ohura, Ogihara & Imai, 2012). Já no Homem, sabe-se que a sua expressão é regulada por recetores nucleares, que incluem as vias PPAR- γ 1, -2 (recetores ativados por proliferador de peroxissoma γ 1 e 2) (Khateeb, Gantman, Kreitenberg, Aviram & Fuhrman, 2010), as cinases p53, p44 / 42, a JNK (cinase c-Jun N-terminal), as proteínas cinase C, os fatores de transcrição SP1 (proteína específica 1), o c-Jun, as SREBP-2 (proteínas de ligação a elemento regulador de esterol) e o Ahr (recetor aril hidrocarboneto) (Litvinov, Mahin & Garelnabi, 2012). A estrutura da PON1 consiste em seis lâminas β -hélice e três α -hélices e, é através destas últimas que a enzima se fixa às HDL (figura 1) (Harel *et al*, 2004).

Figura 1: Estrutura da PON1 (Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/PON1>).



A PON1 é uma enzima sintetizada pelo fígado, pertence à família das proteínas de fase aguda rápida negativa e tem propriedades antioxidantes (Rossi *et al*, 2014 b). Esta enzima circula no sangue ligada às HDL e protege-as, juntamente com as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), do stress oxidativo e da peroxidação lipídica (Tvarijonaviciute, Tecles, Caldin, Tasca & Cerón, 2012).

O interesse da PON1 surgiu inicialmente em investigação toxicológica devido à sua função protetora nas intoxicações por organofosforados (Ceron *et al*, 2014). Contudo, a alteração dos seus valores circulantes está associada a vários fatores como a doença hepática, a doença renal, a diabetes melitus tipo 1 e 2, a obesidade, as doenças cardiovasculares e as alterações neurológicas graves, sendo estas alterações de natureza oxidativa ou inflamatória (Tvarijonaviciute, Tecles, Caldin, Tasca & Cerón, 2012; Rossi, Giordano, Pezzia, Kjelgaard-Hansen & Paltrinieri, 2013).

A PON1 possui também propriedades anti-inflamatórias, uma vez que reduz a produção de mediadores pró-inflamatórios. Esta está associada à apolipoproteína A1 (apo A1) nas HDL, e exerce uma função protetora através da atividade da arilesterase, devido à hidrólise dos lípidos oxidados. Durante a resposta inflamatória aguda, as HDL perdem a apolipoproteína A1, o colesterol modificado e a maior parte das enzimas associadas às HDL, incluindo a PON1, que é substituída maioritariamente por amiloide sérica A e por ceruloplasmina (Rossi *et al*, 2014 b).

3.1. Avaliação da atividade da PON1

A avaliação da atividade da PON1 pode ser realizada através de ensaios espectrofotométricos, pelo estudo da atividade das enzimas lactonase e arilesterase sérica. Estes ensaios baseiam-se na capacidade que a PON1 tem de hidrolisar determinados substratos. Assim, a atividade da lactonase sérica é avaliada pela medição da hidrólise da 5-isobutil butirolactona (TBBL), sendo a única partilhada com os outros membros da família PON e a atividade da arilesterase sérica é avaliada através da medição da hidrólise de acetato de fenil em fenol ou através da medição da hidrólise do acetato p-nitrofenil em p-nitrofenol. É possível a utilização de outros substratos na avaliação da atividade da PON1, como o paraoxão e as butirolactonas. Contudo, a utilização da metodologia do paraoxão, como substrato, tem diminuído devido à elevada toxicidade intrínseca da substância e devido à influência que o polimorfismo da PON1 tem na sua atividade enzimática. No entanto, a avaliação da atividade da arilesterase e da lactonase não apresenta tais limitações, sendo a atividade desta última a que melhor reflete a atividade da PON1 (Tvarijonaviciute *et al*, 2012).

3.1.1. Fatores que interferem na avaliação da atividade da PON1

No estudo de Tvarijonaviciute *et al* (2012) foram realizados vários ensaios para validar um método de análise espectrofotométrico para a avaliação da atividade da PON1 no sangue. Entre estes, foi avaliada a interferência de vários fatores relacionados com as características das amostras de sangue a analisar, tendo-se então verificado uma diminuição dos valores da PON1

quando a colheita de sangue foi realizada para tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), quando a amostra se encontrava hemolisada (quando a concentração de hemoglobina era igual ou superior 5 g/l) e quando o soro se apresentava lipémico (quando a concentração de triglicéridos era igual ou superior 1,25 g/l) (Tvariionaviciute *et al*, 2012).

3.2. Estudos da atividade da PON1 em Medicina Veterinária

Como já referido, não existem muitos estudos realizados em Medicina Veterinária no âmbito da avaliação da atividade da PON1. Em seguida serão apresentados de forma resumida.

Na leishmaniose canina foi observada uma diminuição dos níveis de atividade da PON1 associada à presença de sinais clínicos graves e consequente grave resposta inflamatória. Martinez-Subiela *et al* (2014) no seu estudo observaram que, cães infetados experimentalmente com leishmaniose apresentavam uma diminuição significativa na atividade da PON1 dois meses após a indução da infeção, o que ocorreu em simultâneo com o aumento da inflamação associada à doença. Contudo, passados quatro meses do início do tratamento destes animais, os valores da atividade da PON1 aumentaram. Observaram ainda que cães infetados naturalmente e com proteinúria apresentaram diminuição dos níveis de atividade da PON1, resultados similares aos que ocorrem na síndrome nefrótica e na diabetes com nefropatia humanos. Tal facto pode ter ocorrido devido ao aumento do stress oxidativo, ao efeito das toxinas urémicas sobre a atividade da PON1 e à inibição direta da enzima (Martinez-Subiela *et al*, 2014). Também no estudo de Rossi, Ibba, Meazzi, Giordano & Paltrinieri (2014 a) se observou que, duas semanas após o início do tratamento dos animais com leishmaniose, os níveis de atividade da PON1 aumentaram até ao valor normal, o que está relacionado com a diminuição do fenómeno oxidativo que ocorre nesta doença (Rossi *et al*, 2014). De acordo com o descrito, Ibba, Rossi, Meazzi, Giordano & Paltrinieri (2015) confirmaram a diminuição dos valores da atividade da PON1 nos doentes com leishmaniose antes do tratamento e o seu aumento com o decorrer do mesmo. Estes autores sugeriram então que a monitorização dos níveis das HDL pode ser utilizada para avaliar a magnitude da oxidação associada à inflamação em cães com leishmaniose.

A babesiose é uma doença que desencadeia um processo de inflamação aguda associada a um processo oxidativo grave. Assim, estudou-se a utilização da avaliação da atividade da PON1 e da concentração das lipoproteínas como marcadores precoces, com o objetivo de os resultados obtidos refletirem o estadió da inflamação e o stress oxidativo. No estudo de Rossi *et al* (2014 b) verificou-se que, antes do tratamento, os cães com babesiose apresentavam valores baixos

de atividade da PON1 e da concentração de HDL. Após o primeiro dia de tratamento, a concentração de HDL aumentou, enquanto a atividade da PON1 apenas aumentou após o sétimo dia de tratamento. Face a estes resultados os autores sugeriram que o aumento das HDL está relacionado com o aumento da atividade da PON1 (Rossi *et al*, 2014 b).

A parvovirose é uma doença que altera o estado inflamatório e oxidante, sendo os biomarcadores da inflamação e de stress oxidativo do maior interesse no controlo da evolução e no prognóstico desta doença. Kocaturk *et al* (2014) observaram que a PON1 diminuiu significativamente em cães com parvovirose comparativamente com cães saudáveis, o que pode ter ocorrido devido à redução da produção de PON1 no fígado em resposta à sépsis ou à endotoxémia, devido ao efeito direto da expressão de PON1 no fígado ou devido ao stress oxidativo associado à parvovirose. Neste estudo observou-se ainda que, na fase mais grave da doença, os níveis de PON1 foram mais elevados que os obtidos nas fases menos graves, o que pode ter ocorrido quer pelo efeito protetor antioxidante quer pelo mecanismo virulento da doença.

Animais infetados com *Dirofilaria immitis* desenvolvem uma resposta inflamatória aguda nos estadios precoces da doença devido à resposta do organismo à infeção e à inflamação. Os cães positivos para o antígeno de *D. immitis*, independentemente da presença ou não de microfilárias ou de sinais clínicos, apresentaram uma diminuição significativa da atividade da PON1 (Méndez *et al*, 2014).

Nas doenças cardiovasculares, as alterações nos níveis de atividade da PON1 têm vindo a ser referenciados. No estudo de Prasad, Krueger & Krueger (2014) observou-se uma diminuição da atividade desta enzima em doentes com infarto do miocárdio e em cães que apresentavam cardiomiopatia dilatada, diminuição esta mais acentuada nas fases mais avançadas da doença. No estudo de Tvarijonaviciute *et al* (2014), observou-se que, animais com hiperadrenocorticismismo apresentavam uma diminuição dos valores de atividade da PON1 comparativamente com os valores observados em animais saudáveis, podendo o efeito direto dos glucocorticóides e a mobilização dos lípidos ser a causa desta alteração.

A pancreatite aguda está descrita como uma inflamação e/ou necrose dos tecidos pancreáticos ou peri-pancreáticos, com ausência de alterações histológicas permanentes, como fibrose ou atrofia acinar. A interação entre as citocinas pró-inflamatórias e o stress oxidativo leva à amplificação da cascata inflamatória e à iniciação de resposta inflamatória sistémica. No estudo de Tvarijonaviciute *et al* (2015) foi observada uma diminuição dos níveis de atividade da PON1 nos cães com pancreatite, havendo uma correlação negativa entre os valores de atividade da PON1 e a gravidade da pancreatite aguda diagnosticada. Os autores observaram ainda que os

animais sobreviventes não apresentavam valores tão baixos de atividade da PON1 quanto os apresentados pelos não sobreviventes (TvariJonaviciute *et al*, 2015).

4. Linfoma

O linfoma é uma doença linfoproliferativa do tecido hematopoiético, causada pela dispersão de células linfoides malignas. Este tem maioritariamente origem nos órgãos sólidos, tal como os linfonodos, o baço, o fígado e a medula óssea (Vail & Young, 2007; Couto, 2010).

4.1. Etiologia e Epidemiologia

O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais reportada nos cães, representando 83% destas e cerca de 5 a 7% de todas as neoplasias (Kimura, Zanini, Nishiya, Dias & Dagli, 2011; Albertus, 2012). A sua incidência anual é de 114/100 000 cães (North & Banks, 2009) sendo que, devido ao aumento da esperança média de vida, esta taxa tende a aumentar (Vail, 2011).

O linfoma é considerado uma afeção multifatorial, não tendo sido ainda identificado nenhum agente etiológico. Contudo, existem evidências do envolvimento genético (Couto, 2010), vírico (Albertus, 2012) e de outros fatores como as alterações nos oncogenes e no gene supressor de tumores, as alterações epigenéticas e as alterações na transdução de sinal. A atividade da telomerase, as alterações no N-ras e no p53, mesmo que raras no cão, estão também implícitas em algumas formas de linfoma. Adicionalmente, alterações no percurso das células, particularmente na família de células B de moléculas proapoptóticas e antiapoptóticas, estão em investigação no linfoma canino (Vail & Young, 2007).

Está ainda associado ao aumento da prevalência de linfoma a exposição a campos magnéticos e a alteração da função imunitária nos cães (por exemplo, animais com trombocitopenia imunomediada), independentemente da sua idade ou género (Vail & Young, 2007; Vail, 2011). Vail (2011) refere também a existência de uma associação entre o desenvolvimento do linfoma e a exposição permanente a eventuais contaminantes presentes em áreas industriais e a herbicidas que contenham ácido fenoxiacético (como o ácido 2,4 – diclorofenoxiacético).

Raças como Boxer, Basset Hound, Rottweiler, Cocker Spaniel, São Bernardo, Scottish Terrier, Airedale Terrier, Bulldogue Inglês e Golden Retriever (Couto, 2010), Chow-chow, Pastor Alemão, Poodle e Beagle, apresentam maior risco de desenvolvimento de linfoma (Kimura *et al*, 2011). A estas Vail (2011) acrescenta ainda o Bull Mastiff e Albertus (2012) o Labrador Retriever.

O linfoma ocorre maioritariamente em cães com idades compreendidas entre os 6 e os 7 anos e a prevalência de género é ainda controversa (Vail & Young, 2007; Kimura *et al*, 2011).

4.2. Classificação

Os linfomas caninos podem ser classificados com base na anatomia, histologia, citologia ou imunofenótipo (Vail, 2011).

4.2.1. Classificação anatômica

Existem quatro formas anatômicas de apresentação de linfoma como se pode observar na tabela 2 (Vail & Young, 2007; Couto, 2010; Vail, 2011).

Tabela 2: Classificação anatômica do linfoma.

Forma Anatômica	Caracterização
Multicêntrica	Linfadenopatia generalizada, envolvimento hepático, esplênico e/ou da medula óssea (representam 80% dos casos)
Mediastínica	Linfadenopatia mediastínica, com ou sem infiltração da medula óssea (representam 3% dos casos)
Digestivo	Infiltração solitária, multifocal ou difusa do trato gastrointestinal, com ou sem linfadenopatia intra-abdominal, ocorre maioritariamente no intestino delgado (representam 7% dos casos)
Extranodal	Afeta qualquer órgão ou tecido, como os rins, os olhos, a pele, os pulmões e o SNC (sistema nervoso central) (representam 3% dos casos)

Vail (2011) considera também o linfoma cutâneo, que tem uma incidência de 6%, como uma forma anatômica e não o inclui nos linfomas extranodais.

4.2.2. Classificação Histológica

Os linfomas resultam de uma expansão clonal de células linfóides diferentes tanto morfológica como imunofenotipicamente (Vail, 2011).

Vários sistemas de classificação histológica têm sido usados para caracterizar o linfoma canino, como o sistema WHO, o REAL, o Kiel e o NCI-Working Formulation (Vail, 2011). Contudo, e apesar da existência de todos estes sistemas de classificação, continua a existir uma grande controvérsia na classificação do linfoma (Kimura *et al*, 2011).

Desde 1980 que a classificação WHO é a mais utilizada (Osborne, 2007). Esta classifica os tumores como sendo de baixo, intermédio ou alto grau histológico. Os linfomas de baixo grau de malignidade são compostos por células pequenas (têm o núcleo menor que os eritrócitos), de baixo índice mitótico (0-2 mitoses/10 campos, com ampliação de 400x) e de progressão

lenta, são pouco responsivos à quimioterapia, mas estão associados a tempos de sobrevivência longos. Em contraste, os tumores de grau de malignidade intermédio e alto, têm alto índice mitótico (6 mitoses/10 campos, com ampliação de 400x), rápida progressão e melhor resposta à quimioterapia (Kimura *et al*, 2011; Vail, 2011).

A classificação de Kiel é baseada no tipo de célula (centroblástica, imunoblástica ou centrocítica) e no imunofenótipo [tipo T, B, misto (T e B) ou nulo (nem T, nem B)]. Esta classificação é importante devido ao seu potencial valor prognóstico, uma vez que determina o tempo de remissão e a sobrevida dos doentes (Kimura *et al*, 2011).

4.2.3. Classificação do Imunofenótipo

Os linfomas podem ser classificados como sendo de células B, células T, mistos ou nulos. Sendo que, os linfomas de células B têm maior incidência (60 a 80% dos casos), enquanto os nulos têm menor (que ocorrem em 5% dos doentes) (Vail & Young, 2007; Vail, 2011). Contudo, no estudo de Kimura *et al* (2011) foi observada maior prevalência dos linfomas de célula T de índice mitótico alto.

A forma mediastínica, digestiva, hepatoesplénica e cutânea nos cães foi associada ao fenótipo de células T, enquanto o linfoma intravascular tem origem nas células B, T ou pode mesmo ser de imunofenótipo nulo. Os linfomas cutâneos de células B geralmente afetam camadas profundas da derme (Vail & Young, 2007).

Parece ainda existir uma relação entre as raças e o imunofenótipo, por exemplo, no Cocker Spaniel, no Doberman Pinscher e no Rottweiler é observada uma maior incidência de linfomas de células B, enquanto no Boxer existe maior prevalência de linfoma de células T (Balducci, 2007; Vail & Young, 2007).

4.3. Proliferação Celular dos Linfomas

A proliferação celular neoplásica está relacionada com o comportamento biológico do tumor, podendo ser avaliada por técnicas de histoquímica para contagem dos AgNORs ou, por imunohistoquímica para marcação do antígeno Ki-67 (Suzano, Sequeira, Pessoa, Porto & Oliveira, 2008).

As AgNOR são estruturas intranucleares relacionadas com a síntese de proteínas nas células em proliferação que aumentam na presença de divisão celular e assim, o seu número é proporcional ao índice de proliferação celular, tendo então as neoplasias de alto grau de malignidade um maior número de AgNORs (Kiupel, Teske & Bostock, 1999; Suzano *et al*, 2008).

O antígeno Ki-67 pode ser detetado em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀, e tem uma relação direta com a fração de crescimento da população celular é então possível observar uma correlação positiva entre a proporção de células positivamente marcadas pelo Ki-67, a morfologia celular, o imunofenótipo e o grau de malignidade das neoplasias (Suzano *et al*, 2008).

4.4. Sinais clínicos

Os sinais clínicos apresentados pelos doentes variam de acordo com a localização anatômica (Couto, 2010) e com a extensão do linfoma (Vail & Young, 2007).

Dos animais com linfoma multicêntrico ou generalizado, apenas 20 a 40% apresentam sinais clínicos, sendo estes normalmente vagos e inespecíficos, como linfadenomegália, perda de peso, anorexia, letargia, vômito, diarreia, ascite, dispneia, poliúria/polidipsia (PU/PD) e febre (Vail & Young, 2007; Couto, 2010; Vail, 2011). Na sequência da linfadenomegália podem haver efeitos secundários, como a ocorrência de edema devido à obstrução da drenagem linfática e tosse devido à compressão das vias aéreas (Couto, 2010). Os animais com linfoma multicêntrico podem ainda apresentar alterações hemodinâmicas, tromboembolismo, lesões oculares (descolamento da retina ou vasos sanguíneos tortuosos), sinais neurológicos e infeções (Albertus, 2012).

Os cães com linfoma mediastínico podem-se apresentar com linfadenomegalia mediastínica anterior (Albertus, 2012) e com aumento do timo (Vail & Young, 2007). Os principais sinais clínicos são provocados pela linfadenomegalia e consistem em dispneia, tosse e regurgitação, podendo-se ainda observar edema da cabeça, do pescoço e/ou dos membros anteriores. Nesta forma da neoplasia pode-se também observar PU/PD e hipercalcémia (Vail & Young, 2007; Couto, 2010).

Os linfomas digestivos provocam sinais clínicos gastrointestinais, como vômito, anorexia, diarreia e perda de peso (Vail & Young, 2007; Couto, 2010; Vail, 2011). Podendo ocorrer ainda obstrução intestinal ou peritonite como consequência da rotura da neoplasia (Couto, 2010). O exame clínico destes animais revela geralmente uma ou mais alterações intra-abdominais, como linfadenomegália dos linfonodos mesentéricos e ileocecólicos, formações intestinais, ansas intestinais espessadas (Couto, 2010) ou a presença de uma massa abdominal (Vail, 2011).

Os animais com linfoma renal apresentam sinais clínicos que incluem azotemia, PU/PD e eritrocitose e no exame físico, observam-se alterações renais como renomegália, irregularidade e firmeza. Esta forma da doença pode levar ao desenvolvimento secundário de linfoma do sistema nervoso central (SNC) (Couto, 2010).

O linfoma do sistema nervoso pode envolver o SNC ou o sistema nervoso periférico e os sinais clínicos podem ser solitários ou multifocais (Couto, 2010). Assim, os animais podem apresentar paralisia, parésia, claudicação, atrofia muscular e alterações do sistema nervoso central. Este tumor pode ser primário ou acompanhar a forma multicêntrica (Vail & Young, 2007; Albertus, 2012).

No linfoma ocular, os sinais clínicos apresentados pelos doentes são cegueira, blefarospasmo, epífora, hifema, hipópio, infiltração da terceira pálpebra, fotofobia, uveíte, deslocamento da retina, glaucoma (Couto, 2010), espessamento da íris e sinequia posterior (Vail & Young, 2007). Este tipo de tumor é mais comum nos gatos que nos cães e pode ser primário ou secundário ao linfoma multicêntrico (Albertus, 2012).

Os sinais clínicos dos animais com linfoma nasofaríngeo estão relacionados com alterações do trato respiratório superior como espirros, corrimento nasal uni ou bilateral, estertor respiratório, exoftalmia e deformação facial. Este é comum nos gatos mas raro nos cães (Couto, 2010).

No linfoma pulmonar os sinais apresentados pelos doentes são tosse e dispneia (Couto, 2010). Uma vez que o linfoma intravascular implica a proliferação de linfócitos neoplásicos para o lúmen e para a parede dos vasos sanguíneos, na maioria dos casos existe envolvimento do SNC e do sistema nervoso periférico (incluindo o olho). Assim, os sinais apresentados são a paraparésia, a ataxia, a hiperestesia, as convulsões, a cegueira, a letargia, a anorexia, a perda de peso, a diarreia, a PU/PD e a febre intermitente (Vail & Young, 2007).

Os sinais clínicos do linfoma cutâneo, que pode ser primário ou secundário (Couto, 2010; Albertus, 2012), são normalmente generalizados (Vail, 2011). Sendo que as lesões se podem manifestar através de inflamação local, descamação, hiperémia com ou sem prurido, seborreia, dermatite, foliculite, máculas, pápulas e pododermatite (Ackerman & Regato, 2007; Vail & Young, 2007). Contudo, e embora o linfoma cutâneo primário tenha origem na pele, este pode metastizar nos órgãos abdominais, linfonodos e medula óssea (Albertus, 2012).

4.5. Síndrome paraneoplásica do Linfoma

A síndrome paraneoplásica mais observada nos cães com linfoma é a hipercalcémia maligna, que está presente em cerca de 40% dos casos (North & Banks, 2009), ocorrendo maioritariamente nos linfomas mediastínicos e nos linfomas de células T (Couto, 2010; Vail, 2011).

A anemia hemolítica imunomediada e a trombocitopenia são também síndromes paraneoplásicas associados ao linfoma (North & Banks, 2009). A trombocitopenia é observada em cerca de 30 a 50% dos casos, contudo a hemorragia espontânea raramente é um problema.

Outra síndrome paraneoplásica, que pode estar presente em cerca de 20% dos cães com linfoma, é a linfocitose (Vail, 2011).

4.6. Diagnósticos Diferenciais (DD)

No linfoma os DD variam de acordo com a localização da doença (Vail, 2011).

No linfoma multicêntrico os DD incluem infecções por bactérias (*Ehrlichia spp* e *Neorickettsia helminthoeca*), vírus, parasitas, (*Toxoplasma* e *Leishmania*), fungos (*Blastomyces* e o *Histoplasma spp.*) (Vail & Young, 2007), doenças autoimunes, micose sistêmica, piodermite grave ou qualquer outro problema de pele e hiperplasia reativa (Thamm, 2011), vasculites, poliartrite, lúpus, neoplasias com metástases nos linfonodos e outros tumores hematopoiéticos como a leucemia, mieloma múltiplo e histiocitose maligna ou sistêmica (Vail, 2011).

No linfoma digestivo os DD considerados passam pelas enterites graves primárias ou secundárias, enterites infiltrativas como as enterites linfocíticas ou plasmocíticas e, qualquer outra neoplasia do trato gastrointestinal (Vail, 2011).

O linfoma cutâneo tem como DD as dermatites infecciosas (como a piodermite avançada), as dermatites imunomediadas (como o pênfigo) ou qualquer outro tumor com manifestação cutânea (Vail, 2011).

Os DD do linfoma mediastínico incluem outras neoplasias (como o timoma, o quimiodectoma, o carcinoma ectópico da tireoide e o carcinoma na pleura), a granulomatose pulmonar linfomatóide, as doenças infecciosas (como o piotórax), a insuficiência cardíaca congestiva, o quilotórax e o hemotórax (Vail, 2011).

4.7. Diagnóstico

Independentemente da localização anatômica, para a avaliação e para o diagnóstico de um doente com linfoma é necessário exame físico completo, hemograma, perfil bioquímico (incluindo cálcio ionizado), urianálise, punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e/ou biópsia. Estes exames complementares permitem fazer o estadiamento da doença e avaliar o grau de mielossupressão dos doentes (Vail & Young, 2007; Vail, 2011; Albertus, 2012).

4.7.1. Exame físico

O exame físico deve incluir a palpação de todos os linfonodos incluindo os que são palpáveis apenas através de exame rectal. Devem ser observadas as mucosas, por forma a identificar sinais de palidez, icterícia, petéquias e ulceração, uma vez que estes sinais podem ser indicativos de anemia e trombocitopenia secundária a mieloptose, doença imunomediada, evidência de

insuficiência de um órgão ou urémia. Deve-se realizar a palpação abdominal para avaliação de organomegalias, aumento da espessura da parede intestinal e linfadenopatia mesentérica e, auscultação torácica que permite identificar a existência de massas mediastínicas ou derrame pleural. É ainda importante o exame ocular, incluindo a fundoscopia, de forma a observar a existência de uveíte, de hemorragia da retina ou de infiltração ocular (Vail & Young, 2007).

4.7.2. Hematologia, Bioquímica sérica e Urinálise

As alterações hematológicas, observadas nos doentes com linfoma, resultam da infiltração da medula óssea por células neoplásicas, hipofunção ou hiperfunção esplénica, doença crónica ou síndromes paraneoplásicas imunomediadas como a anemia hemolítica ou a trombocitopenia imunomediada. Outras alterações como a monocitose e as alterações nos leucócitos podem resultar da produção local ou sistémica de substâncias bioativas pelas células tumorais (Couto, 2010).

As alterações mais comumente observadas no hemograma dos animais com linfoma são a presença de anemia (sendo a mais comum a não regenerativa, podendo também ocorrer anemia hemolítica ou hemorrágica), leucocitose, neutrofilia, monocitose, linfocitose (de baixa magnitude), células linfóides anormais no sangue periférico, trombocitopenia, citopénias isoladas ou combinadas e reações leucoeritoblásticas (Vail & Young, 2007; Couto, 2010).

As alterações dos parâmetros avaliados nas análises bioquímicas resultam da produção de substâncias bioativas pelas células tumorais ou da falência de órgãos secundária à infiltração neoplásica. A hiperproteinémia pode ser secundária à produção de uma proteína monoclonal pelas células do linfoma e pode resultar no desenvolvimento de síndromes de hiperviscosidade (Couto, 2010). O aumento da ureia sérica e da creatinina pode ocorrer secundariamente à infiltração renal pelo tumor, à nefrose hipercalcémica ou à azotemia pré-renal devido a desidratação (Vail & Young, 2007).

A urinálise é realizada de forma a analisar a função dos rins e do trato urinário. Por exemplo, a isostenúria e a proteinúria, na ausência de sedimento ativo, podem indicar doença renal e a hematúria pode resultar de uma alteração hemostática (Vail & Young, 2007).

4.7.3. Imagiologia

Os exames complementares imagiológicos permitem avaliar a extensão e o estadió da doença (Vail, 2011; Albertus, 2012).

No linfoma multicêntrico é possível a observação de algumas alterações radiográficas, como por exemplo, linfadenopatia esternal e/ou traqueobrônquica, infiltrado pulmonar intersticial, broncoalveolar ou misto, derrame pleural, linfadenopatia intra-abdominal, formações intra-abdominais, hepatomegália, esplenomegália, renomegália e lesões ósseas líticas ou proliferativas. No linfoma mediastínico, pode-se observar a presença de formações mediastínicas e de derrame pleural. No linfoma digestivo, por vezes é necessário o uso de contraste positivo para a observação das alterações do trato gastrointestinal, como irregularidades da mucosa, defeitos de preenchimento luminal e espessamento irregular da parede sugestivo de doença mural infiltrativa (Couto, 2010).

Embora a radiografia mostre alterações macroscópicas dos órgãos é a ecografia que permite observar a presença de infiltrados ou alterações na sua estrutura (Albertus, 2012).

4.7.4. Citologia e Histologia

Na presença de uma massa suspeita de neoplasia a avaliação de uma amostra citológica obtida por PAAF fornece, em cerca de 90% dos casos, o diagnóstico definitivo (Couto, 2010).

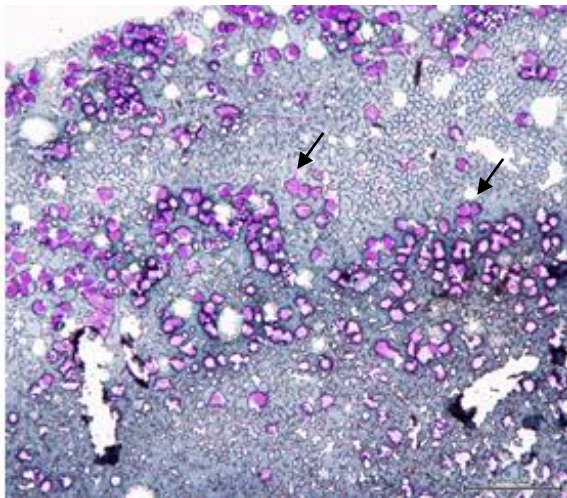
Citologicamente, os linfomas caracterizam-se pela presença de uma população celular abundante monomórfica ou homogénea, uma vez que as células se encontram todas no mesmo estadió de maturação. Pode, contudo, existir variabilidade no tamanho nuclear e no quociente núcleo:citoplasma, múltiplos nucléolos mais ou menos destacados, figuras frequentes de mitose, vacuolização e por vezes granulações azurofílicas citoplasmáticas (Couto, 2010; Albertus, 2012). As células analisadas podem ser constituídas por pequenos linfócitos ou, mais frequentemente, por grandes linfoblastos. A presença de linfoblastos permite estabelecer o diagnóstico citológico, uma vez que são células predominantes, duas vezes superiores aos neutrófilos e, em situações normais, não se encontram na pele, medula óssea, fígado, intestino ou noutro órgão não linfóide. O citoplasma destas células é escasso, azulado, por vezes vacuolizado e o núcleo é usualmente recuado com um a três nucléolos finos proeminentes (Thrall, 2007).

Do ponto de vista citológico, os linfomas caracterizam-se em linfomas bem diferenciados ou linfocíticos (nos quais há células neoplásicas linfóides redondas e pequenas, com a cromatina nuclear condensada ou com granulações, com o nucléolo pouco visível e com um halo citoplasmático muito escasso), em linfomas moderadamente diferenciados ou prolinfocíticos

(caracterizados pela presença de células linfoblásticas pequenas, médias e grandes, com a cromatina nuclear com grânulos e com um halo citoplasmático escasso mas visível), em linfomas escassamente diferenciados ou linfoblásticos (nos quais as células têm uma morfologia e tamanho mais ou menos uniforme, um núcleo redondo ou ovalado de limites bem definidos, com uma distribuição finamente granular da cromatina, com a presença de um ou mais nucléolos destacados e com um halo citoplasmático claramente visível) e em linfomas de células grandes (que são um grupo heterogêneo de células, normalmente grandes e por vezes muito pleomórficas, com citoplasma abundante, de diferente intensidade de coloração, com núcleos grandes, vesiculares, de morfologia e padrão cromático muito heterogêneos) (Albertus, 2012).

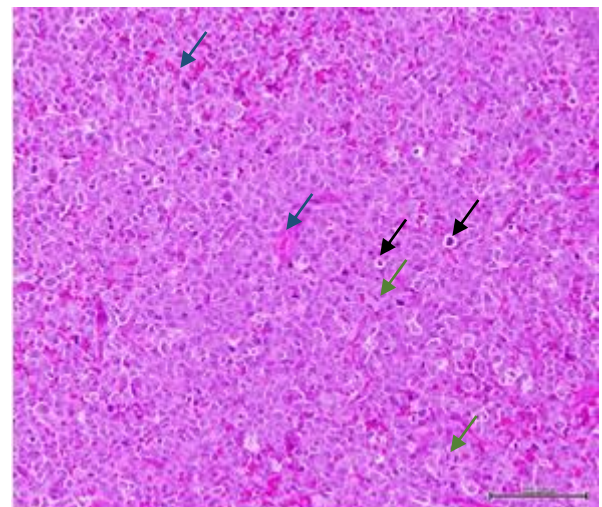
De maneira alternativa ou adicional, pode-se efetuar uma biópsia de forma a classificar histologicamente o nódulo tumoral, o seu tipo celular, o padrão de crescimento e o imunofenótipo (North & Banks, 2009; Vail, 2011; Albertus, 2012).

Figura 2: Microfotografia de esfregaço de linfoma (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).



Legenda: Esfregaço obtido por PAAF de linfonodo pré-escapular direito. Na figura observam-se células com morfologia compatível com centroblastos neoplásicos (setas). (Coloração Giemsa. Barra 100 µm).

Figura 3: Microfotografia da lâmina do exame histopatológico de linfoma (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).



Legenda: Exame histopatológico obtido por biópsia de linfonodo. Na figura observam-se centroblastos, com padrão de crescimento difuso e com elevado índice mitótico. As setas a preto indicam a localização de células apoptóticas, as setas a verde indicam figuras de mitose em anafase e as setas a azul indicam a localização de eritrócitos, revelando bastante vascularização do tecido neoplásico. (coloração hematoxilina e eosina. Barra 100 µm).

4.7.5. Imunofenotipagem

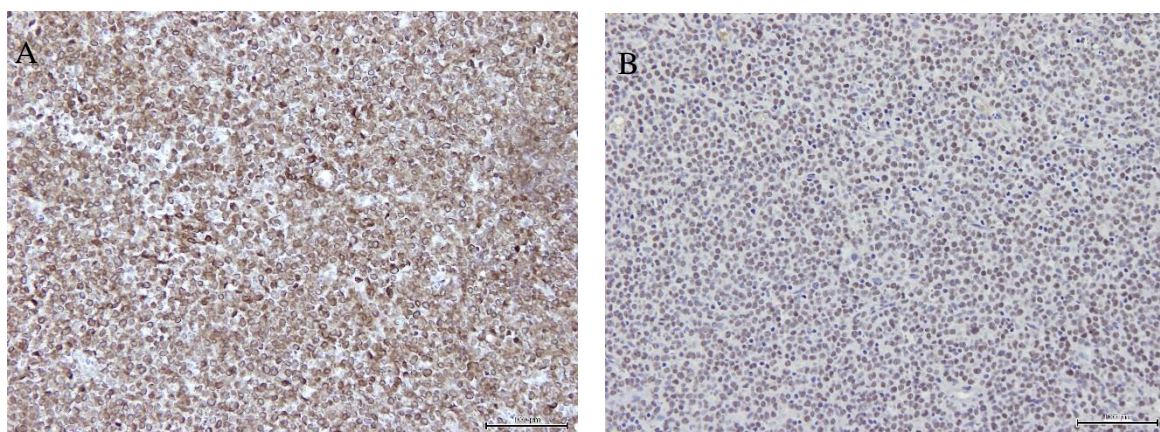
A imunofenotipagem de um linfócito é identificada pela determinação da expressão de moléculas específicas das células B e T (Vail & Young, 2007).

Sabe-se que os linfomas são expansões clonais de linfócitos e que cada neoplasma tem uma região de ADN única no comprimento e na sequência. Contudo, nem todas as sequências clonais são necessariamente malignas, podendo as amostras apresentar rearranjos clonais sem evidência de linfoma (Thrall, 2007). Na clonalidade de um linfoma de células T, todas as células malignas têm a mesma sequência de ADN para uma região variável do recetor do gene das células T, enquanto nos doentes com linfoma de células B, os linfócitos malignos têm sequências de ADN idênticas na região variável do gene recetor de imunoglobulina (Vail & Young, 2007; Vail, 2011).

A classificação dos imunofenótipos é obtida por técnicas que detetam ligações específicas antígeno-anticorpo para os seus alvos antigénicos numa secção de tecido. Os antígenos marcadores usados nos linfomas são o CD3 (marca células T), o antígeno CD79 α e o PAX5 (marcam células B) (Scase & Dobson, 2011).

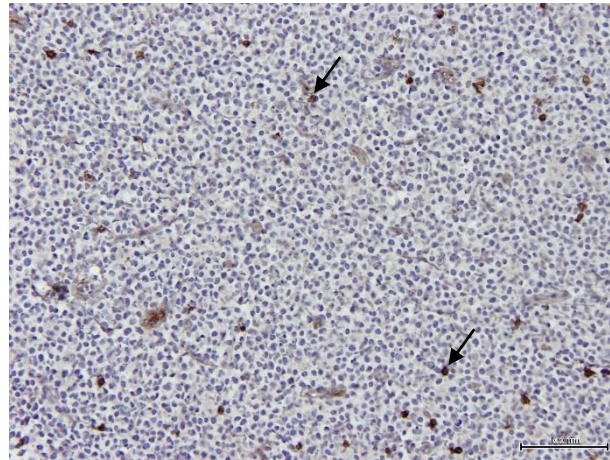
Os métodos de avaliação da imunofenotipagem incluem a análise de clonalidade por reação em cadeia da polimerase (PCR), a imunocitoquímica, a imunohistoquímica e a citometria de fluxo (Vail & Young, 2007; Couto, 2010; Thamm, 2011).

Figura 4: Microfotografia da lâmina de imunohistoquímica, A) para o anticorpo anti-CD79 (DAKO, clone HM57) e B) para o anticorpo anti-PAX (NOVOCASTRA) (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).



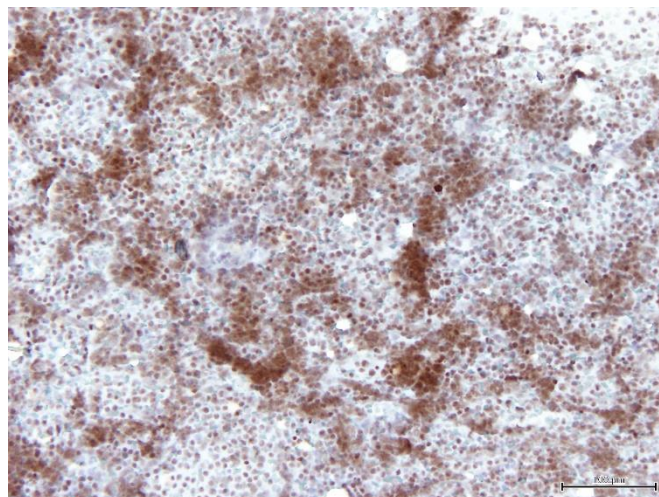
Legenda: A) A figura mostra a presença de população de células B, com uma marcação fortemente positiva para o anticorpo anti-CD79 α cy, de tipo membranar. B) Observa-se na figura a presença de marcação nuclear fraca dos centroblastos no linfoma de células B. (Coloração de fundo, hematoxilina de Mayer. Barra 100 μ m).

Figura 5: Microfotografia da lâmina de imunohistoquímica para o anticorpo anti-CD3 (DAKO) (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).



Legenda: Na figura observa-se uma imunomarcção negativa para as células neoplásicas, sendo que as poucas células que surgem positivas se encontram dispersas (seta) (Coloração de fundo, hematoxilina de Mayer. Barra 100 µm).

Figura 6: Microfotografia da lâmina de imunocitoquímica para o anticorpo anti-PAX5 (NOVOCASTRA) (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).



Legenda: Na figura é possível observar a marcação nuclear de intensidade forte para o anticorpo anti-PAX5, a imunomarcção foi efetuada em esfregaço de PAAF de um linfonodo, revelando linfoma de células B imaturas centroblásticas.

4.8. Sistema de estadiamento Tumor, Nódulos e Metástases (TNM)

O estadiamento do linfoma canino é baseado na doença multicêntrica (North & Banks, 2009) e foi delineado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (tabela 3), utilizando informações clínicas e clinicopatológicas de forma a determinar a extensão da doença e relacioná-la com o prognóstico (Couto, 2010).

Tabela 3: Estadiamento de cães com linfoma da OMS (Adaptado de Thamm, 2011).

Estadio	Caracterização
I	Doença confinada a um único linfonodo
II	Linfadenopatia regional (confinado a um lado do diafragma)
III	Linfadenopatia generalizada
IV	Hepatoesplenomegália (com ou sem linfadenopatia)
V	Envolvimento da medula óssea, SNC e outros órgãos extranodais
	a) Sem sinais clínicos
	b) Com sinais clínicos

4.9. Tratamento

A abordagem terapêutica dos doentes com linfoma é determinada pelo seu estado clínico e de acordo com a localização, o estadio e o sub-estadio da doença, pela presença de síndromes paraneoplásicas e pela disponibilidade financeira, temporal e nível de conforto dos proprietários (Vail & Young, 2007). Após estabelecido o diagnóstico de linfoma, a melhor abordagem terapêutica passa pela realização de um tratamento agressivo, uma vez que nesse momento a oportunidade de erradicar todas as células tumorais é mais elevada (Couto, 2010).

4.9.1. Cirurgia

A cirurgia é curativa apenas no linfoma solitário de estadio I ou extranodal solitário. Nestes é requerido um estadiamento cuidadoso, de forma a descartar a possibilidade de envolvimento multicêntrico (Vail & Young, 2007; North & Banks, 2009; Vail, 2011).

4.9.2. Radioterapia

O uso da radioterapia na terapêutica do linfoma é limitada, uma vez que se trata, na sua maioria, de uma doença sistêmica (North & Banks, 2009). A radioterapia está indicada nos linfomas

solitários de estadió I ou II, no tratamento paliativo da doença local (linfadenopatia mandibular, linfoma retal, linfoma mediastínico acompanhado de edemas faciais ou dos membros anteriores e, envolvimento ósseo localizado), na radiação do corpo todo com transplante de medula óssea ou de células estaminais e na radiação de metade do corpo após remissão induzida por quimioterapia (Vail & Young, 2007).

Os efeitos adversos da radioterapia incluem síndrome de lise tumoral, mielosupressão, granulocitose, trombocitopenia e alguns sinais gastrointestinais (Axiak et al, 2006).

4.9.3. Quimioterapia

A quimioterapia é o tratamento de eleição para os doentes com linfoma (Thamm, 2011). Tem como objetivos a indução da remissão da neoplasia, a sua manutenção quando alcançada e a intensificação do esquema quando não se alcança a remissão completa (Vail & Young, 2007; Albertus, 2012).

Embora existam vários protocolos, tanto de fármacos únicos como associados, não existe um protocolo ótimo, ou seja, um protocolo com um prognóstico positivo, baixa toxicidade e custo reduzido (Thamm, 2011). Assim, a escolha da terapêutica quimioterápica, deve ser feita de acordo com o doente, as preocupações do proprietário e a experiência do médico veterinário (North & Banks, 2009).

As associações de fármacos mais complexas resultam em tempos de remissão e de sobrevivência mais longos. São, contudo, monetariamente mais dispendiosas, exigem maior disponibilidade de tempo por parte dos proprietários (devido às repetidas visitas ao consultório veterinário) e apresentam maior probabilidade de induzir toxicidade (Vail & Young, 2007; North & Banks, 2009; Vail, 2011). O objetivo da utilização de vários fármacos passa pela maximização da necrose celular sem toxicidade para o hospedeiro, pela diversidade de mecanismos de acção de forma a atingir células heterogéneas, com mutações e resistentes e, pela prevenção e retardamento do aparecimento de clones resistentes (Osborne, 2007).

A implementação do protocolo de manutenção após remissão do linfoma é opcional (Couto, 2010), uma vez que, não existem ainda estudos que comprovem o seu benefício a longo prazo nos cães (Vail & Young, 2007).

4.9.3.1. Protocolo CHOP

O protocolo CHOP representa a combinação entre ciclofosfamina (C), doxorrubicina (H – hidroxidaunarubicina), vincristina (O – oncovin) e prednisolona (P) (tabela 4). A remissão completa da neoplasia com este protocolo tem um tempo médio de 8 meses e ocorre em 80 a

90% dos doentes. O tempo de médio de vida é de 12 meses, aproximadamente 25% dos cães atingem 2 anos de vida após o diagnóstico e existem ainda doentes que conseguem a cura (Vail & Young, 2007; Vail, 2011).

Vail & Young (2007) referem que, se houver remissão completa, todos os tratamentos devem ser descontinuados após a 19ª semana, deverá ser realizada a monitorização do doente através da reavaliação mensal dos linfonodos e do local de origem da neoplasia (Vail, 2011).

No seguimento do tratamento com ciclofosfamida e se o doente desenvolver cistite hemorrágica estéril, deve ser suspensa a administração deste fármaco e realizada a administração de clorambucilo (1,4 mg/kg PO) associado à furosemida (1 mg/Kg IV) (Vail & Young, 2007).

Tabela 4: Protocolo CHOP para o linfoma canino (Adaptado de Vail & Young, 2007).

Fármacos	Semanas																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Vincistina 0,7 mg/m ² IV	●		●			●		●			●		●			●		●	
Ciclofosfamida, 250 mg/m ² IV		●					●					●					●		
Doxorrubicina, 30 mg/m ² IV				●					●					●					●
Prednisolona, 2 mg/kg PO SID	●																		
Prednisolona, 1,5 mg/kg PO SID		●																	
Prednisolona 1 mg/kg PO SID			●																
Prednisolona, 0,5 mg/kg PO SID				●															

Os animais com mutações no gene MDR-1 (multirresistência a fármacos), como os cães da raça Collie, desenvolvem toxicidades elevadas e não esperadas aos fármacos. Nestes animais inicia-se a terapêutica do protocolo CHOP com um fármaco não associado ao MDR-1, como a ciclofosfamida, de forma a permitir a análise das mutações do gene já no decorrer do tratamento e serem posteriormente adicionados os restantes fármacos à terapêutica (Vail & Young, 2007).

4.9.3.2. Protocolo fundamentado em COP

O protocolo COP consiste na associação de ciclofosfamida com vincristina e prednisolona (tabela 5) (Albertus, 2012), é relativamente simples, não é tóxico e envolve poucos custos. Cerca de 75% dos doentes respondem a este tratamento, com uma sobrevida média entre os 6 e os 8 meses (Thamm, 2011).

Tabela 5: Protocolo COP dose alta para indução de remissão (Adaptado de Albertus, 2012).

Fármaco	Dose
Ciclofosfamida	250 – 300 mg/m ² PO a cada 21 dias
Vincristina	0,75 mg/m ² IV cada 7 dias durante 4 semanas, depois, a cada 21 dias
Prednisolona	1 mg/Kg PO SID durante 4 semanas, depois, a cada 48h

A fase de iniciação do protocolo decorre durante 6 a 8 semanas e, se houver remissão completa é implementada a fase de manutenção, na qual se procede à associação de fármacos como o clorambucilo, o metotrexato e a prednisolona. Contudo, se no final do tratamento de iniciação o doente não estiver em remissão completa deverá ser realizada uma intensificação do protocolo com L-asparaginase antes da fase de manutenção (Couto, 2010; Albertus, 2012).

4.9.3.3. Corticosteróides

A administração de corticosteróides, como a prednisolona (2 mg/kg/dia dose inicial seguida de desmame, por via oral), é um tratamento a considerar nos animais cujos proprietários recusam a utilização de fármacos citostáticos. Este é um tratamento limitado, no qual a maioria dos cães apresenta uma melhoria a curto prazo, apenas de 1 a 2 meses, podendo nalguns casos induzir remissão parcial da neoplasia. Nos animais com estadios avançados da doença, a utilização destes fármacos induz melhorias no apetite, na atividade, na atitude e induz a redução da hipercalecémia quando presente (Vail & Young, 2007; Thamm, 2011; Albertus, 2012).

4.9.3.4. Doxorrubicina

A administração deste fármaco é o protocolo de eleição quando os proprietários não optam pelo protocolo CHOP (Thamm, 2011; Vail, 2011). A doxorrubicina (30 mg/m² IV) é administrada a cada 3 semanas durante 5 tratamentos. Este protocolo tem uma taxa de sucesso entre os 50 e os 75%, o tempo médio de remissão é de 5 meses e a sobrevida é de 6 a 8 meses (Vail & Young, 2007).

4.9.4. Complicações da quimioterapia

A maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia não são seletivos, ou seja, atuam tanto nos tecidos neoplásicos como nos tecidos normais do hospedeiro. Os efeitos secundários mais frequentemente observados são a mielosupressão e os sinais gastrointestinais, estando ainda descritas complicações relacionadas com reações anafiláticas, toxicidade dermatológica, pancreatite, cardiotoxicidade, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, hepatopatias e urotoxicidade (Couto, 2010).

4.9.5. Recorrência do linfoma e a reintrodução do tratamento ou tratamento de resgate

As neoplasias podem adquirir resistências aos fármacos através de vários mecanismos e no linfoma canino a sobreexpressão da glicoproteína P é uma das principais causas que induz o fenótipo de multirresistência aos fármacos (MDR), manifestando-se para fármacos anti microtúbulos (ex.: vincristina), para as antraciclinas (ex.: doxorrubicina) e para a prednisolona, não ocorrendo com os agentes alquilantes (North & Banks, 2009).

Após o início do tratamento é esperada a remissão da neoplasia, sendo esta monitorizada pelos proprietários através da palpação dos linfonodos e do local da neoplasia primária, pelo menos duas vezes por semana (Meyers, 2007). Quando há uma recidiva da doença, esta é tipicamente mais resistente ao tratamento (Vail, 2011). Na primeira recorrência o tratamento passa pela re-indução do protocolo de indução sem, no entanto, descuidar alguns parâmetros como por exemplo, as doses cumulativas de doxorrubicina (Osborne, 2007; Vail & Young, 2007; North & Banks, 2009; Vail, 2011). No caso de o animal não responder a esta abordagem terapêutica, recorre-se à chamada quimioterapia de salvamento ou de resgate (Vail & Young, 2007).

Os protocolos de salvamento ou de resgate são compostos por fármacos únicos ou associações de fármacos que não foram utilizados no tratamento de indução (Osborne, 2007), como por exemplo a lomustina, a actinomicina D, a mitoxantrona, a L-asparaginase, a dactimonicina, a doxorrubicina (no caso de não ter sido utilizada anteriormente), a associação de doxorrubicina e dacarbazina, a associação de vimblastina, procarbazina e mecloretamina e, a associação de vincristina, procarbazina e prednisolona (MOPP) (Vail & Young, 2007 e Vail, 2011). As respostas a estes protocolos variam entre os 40 e 50% e as remissões duram em média 1,5 a 2,5 meses (Vail & Young, 2007).

4.10. Futuras modalidades de tratamento

Atualmente tem-se investigado o desenvolvimento de novas terapêuticas que permitam melhorar o tempo de remissão e de sobrevida dos doentes com linfoma. Assim, referem-se: - as imunotoxinas recombinantes, das quais se destacam as interleucinas-2 (IL-2) recombinantes (Albertus, 2012); - os anticorpos monoclonais, dos quais se destaca o Mab-231, um anticorpo monoclonal anticanino derivado de murídeo (Imunoglobulina G 2a) que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos e do complemento e previne o desdobramento dos xenotransplantes nos murídeos (Vail & Young, 2007), mostrando aumentar o tempo de remissão nos cães com quimioterapia adjuvante (Lawman *et al*, 2008); - as vacinas, sendo que as vacinas autólogas mostraram ter efeitos positivos no cão quando combinadas com quimioterapia (Vail & Young, 2007; Lawman *et al*, 2008; Albertus, 2012); - as viroses oncológicas (nas quais se destaca a utilização da esgana atenuada e marcada com fluoresceína), que promovem infecção das linhas de células linfóides caninas e dos linfócitos isolados do linfoma canino, provocando a morte de uma grande percentagem de células infetadas (Biller & Dow, 2007); - os inibidores da tirosina-cinase, dos quais se destaca o masitinib que foi já utilizado em linfomas de células T, nos quais se obteve uma remissão completa (Albertus, 2012).

4.11. Alimentação

Concomitantemente com a quimioterapia, as dietas ricas em ácidos gordos, podem levar ao aumento do intervalo de remissão e da sobrevida dos doentes com linfoma (Albertus, 2012), facto descrito em animais com estadio III da doença (Mauldin, 2007).

O mecanismo pelo qual a suplementação de ácidos gordos melhora a resposta ao tratamento convencional passa pela diminuição dos níveis plasmáticos de ácido láctico (produto final do metabolismo anaeróbio da glucose, utilizado preferencialmente pelas células neoplásicas) e pela libertação de insulina independentemente da dose suplementada (Albertus, 2012).

Os ácidos gordos polinsaturados têm atividade antitumoral, talvez secundária à peroxidação lipídica e à produção de radicais livres, levando à inibição da proliferação celular e à promoção de apoptose (Mauldin, 2007).

Contudo, o consumo excessivo de ácidos gordos $\Omega 3$ leva a uma diminuição da síntese de tromboxano A₂ e aumenta a produção de prostaglandina I₃ no Homem. Há, então, um aumento da agregação plaquetária e a vasoconstrição, predispondo assim para a ocorrência de alterações na coagulação. No cão, a ingestão de grandes quantidades de ácidos gordos polinsaturados aumenta a peroxidação lipídica nos tecidos e induz supressão significativa de imunidade mediada por células (Mauldin, 2007).

4.12. Prognóstico

O prognóstico do linfoma canino é variável e depende de uma série de fatores, como a localização e a extensão da doença, a presença ou ausência de sinais clínicos, o estadió histopatológico e o imunofenótipo, a exposição anterior a quimioterápicos ou corticóides e o eventual desenvolvimento de multirresistências aos fármacos, a alteração no processo de morte celular e da proliferação tumoral, a presença de síndromes paraneoplásicas ou de doenças concomitantes e, possivelmente o género (Vail & Young, 2007).

Os resultados da imunofenotipagem são importantes no estabelecimento do prognóstico, uma vez que o linfoma de células T é menos responsivo à quimioterapia que o de células B, pelo que tem pior prognóstico (Kiupel *et al*, 1999; Emerson, 2007). Tal pode ocorrer devido ao comportamento mais agressivo por parte do linfoma de células T, comparativamente com o linfoma de células B, o que se traduz num aumento da ocorrência de síndromes paraneoplásicas, numa diminuição da taxa de remissão e da sobrevida (Kimura *et al*, 2011; Albertus, 2012).

O tratamento instituído é outro fator crucial e condicionante em termos de prognóstico, uma vez que, animais sem tratamento têm uma sobrevida média de 4 a 6 semanas (Vail & Young, 2007). No tratamento só com corticosteróides a sobrevida média é de 3 meses, enquanto na quimioterapia com fármacos citostáticos associados pode prolongar-se até aos 6 a 9 meses de vida (Albertus, 2012). Quando aplicado o protocolo COP os doentes têm em média 6 meses de vida e com o protocolo CHOP têm em média 12 meses (North & Banks, 2009). Durante o tratamento os proprietários referem haver melhoras significativas do seu animal, estando este em bom estado geral e com melhor qualidade de vida (Vail, 2011).

O estadió da doença é também importante, uma vez que animais no estadió I ou II têm melhor prognóstico que os que se apresentam em estádios mais avançados (Vail & Young, 2007 e Vail, 2011), assim como os animais que se encontram no subestadió a), ou seja, animais que não apresentam sinais clínicos (North & Banks, 2009).

Relativamente aos sinais paraneoplásicos, há estudos que referem o aumento do cálcio sérico, em mais de 11,9 mg/dl como um fator de prognóstico negativo (Vail & Young, 2007).

O grau histológico tem também influência no prognóstico, não estando ainda bem definido o seu envolvimento. Sabe-se que os cães com linfoma de grau de malignidade intermédio e alto (células grandes, centroblásticas e imunoblásticas) tendem a responder à quimioterapia mas, por norma, têm recorrência da doença mais cedo. Já os cães com linfoma de baixo grau de malignidade (linfócitos pequenos e centrocíticos) têm uma baixa taxa de resposta à quimioterapia, contudo apresentam maior sobrevida que os anteriores (Vail & Young, 2007).

A localização é também importante, uma vez que os linfomas cutâneos difusos primários, gastrointestinais difusos, hepatoesplénicos e primários do SNC estão associados a um mau

prognóstico. O envolvimento da medula óssea e a circulação de linfócitos malignos são também fatores de mau prognóstico (Vail & Young, 2007).

O gênero é ainda um fator de prognóstico controverso, mas pensa-se que cães machos com linfoma têm menor sobrevida (North & Banks, 2009). Relativamente à raça foi reportado um risco 10 vezes superior de desenvolvimento de linfoma nos Boxers comparativamente a qualquer outra raça (Frimberger, 2008) e, uma maior incidência de linfoma de células T no Boxer e no Sharpei (Vail & Young, 2007).

Atualmente existem novos marcadores de prognóstico em estudo, dos quais podemos destacar:

- a concentração de alfa 1-glicoproteína ácida, que é uma proteína sintetizada pelos hepatócitos em numerosos processos inflamatórios, cuja determinação também é útil para prever recidivas no marcador inflamatório não específico que pode aumentar em processos não neoplásicos;
- a sobreexpressão das metaloproteínas 2 e 9, que são proteases necessárias para a digestão da matriz extracelular, permitem a invasão metastática do tecido e têm sido correlacionadas com um período de remissão mais curto;
- o VEGF cujas concentrações séricas elevadas em animais com linfoma está associada a um pior prognóstico;
- a perda da expressão do antígeno B5 [um antígeno de membrana dos linfócitos B normais (CD79+), cuja função ainda não se conhece com exatidão] está relacionada com períodos de sobrevivência mais curtos;
- a sobreexpressão da glicoproteína P pode induzir o fenótipo de multirresistência aos fármacos (MDR-1) (Albertus, 2012).

Alexandratis *et al* (2014) estudaram ainda a aplicação da utilização da haptoglobina e da proteína C-reativa como biomarcadores de prognóstico, remissão e recidiva em cães com linfoma, tendo observado que quanto mais elevados estão estes valores, pior o prognóstico, menor o tempo de remissão e consequentemente uma recidiva precoce.

5. Mastocitoma

O mastocitoma é uma das neoplasias mais frequentes nos cães. Tem uma incidência de 7 a 20% das neoplasias cutâneas, representa 6% de todas as neoplasias e afeta cerca de 90 a 129 cães por cada 100 000 (Blackwood, 2011; García, 2012). Trata-se de uma neoplasia maligna com uma taxa de metastização bastante variável, podendo estar compreendida entre 10 a 95% (Blackwood, 2011).

5.1. Etiologia

A etiologia do mastocitoma é ainda desconhecida. No entanto, existe uma relação entre o seu desenvolvimento e diversos fatores como a hereditariedade, as infeções víricas e a inflamação. Apesar de não ocorrer em todos os doentes, estudos recentes reportam a observação de uma mutação em c-kit (recetor do fator de células estaminais – “stem cell factor”) a qual é responsável pela iniciação e progressão dos mastocitomas de alto grau de malignidade nos cães (North & Banks, 2009; García, 2012). Foram também identificadas alterações no gene supressor tumoral p53, perturbações na expressão das proteínas p21 e p27 e inibidores de cinase dependente da ciclina. Nos animais com esta neoplasia, foram ainda detetados recetores citosólicos para o estrogénio e para a progesterona, fatores que podem influenciar o desenvolvimento da doença (Thamm & Vail, 2007).

Embora os mastocitomas nos cães possam ocorrer em qualquer idade, a idade média do seu desenvolvimento são os 8 anos de idade e é rara a sua ocorrência em animais com menos de 4 anos (Thamm & Vail, 2007; Blackwood, 2011).

Não é evidente a existência de predisposição rácica nesta neoplasia, contudo, observa-se maior incidência no Boxer, Boston Terrier, Bullmastiff, Bulldog, Setter Inglês, Labrador, Golden Retriever, Teckel, Beagle, Weimaraner (García, 2012), Bull Terrier Americano, Boieiro australiano, Dachshund, Fox Terrier, Pug, Leão da Rodésia, Schnauzer, Sharpei e Staffordshire Bull Terrier (Blackwood, 2011).

Esta neoplasia pode afetar igualmente machos e fêmeas, não existindo maior incidência relacionada com o género (North & Banks, 2009; García, 2012).

5.2. Comportamento Biológico

O mastocitoma tem uma grande variabilidade biológica (Blackwood, 2011) e é por isso conhecido como “o imitador”, pode adquirir diferentes aspetos clínicos, confundindo-se com múltiplas lesões cutâneas (García, 2012).

Dos tumores cutâneos, o mastocitoma é o mais maligno e fatal, sendo o que apresenta maior probabilidade de recorrer aquando de falha no tratamento (Meyers, 2007).

A capacidade metastática desta neoplasia depende fundamentalmente do seu grau histológico, tendo o mastocitoma de grau III uma capacidade metastática de cerca de 75%. As metástases localizam-se nos linfonodos regionais, no baço, no fígado, nos rins, no coração e no tecido subcutâneo. A metastização pulmonar, na qual se observam nódulos difusos no parênquima pulmonar é bastante rara (Thamm & Vail, 2007; García, 2012).

Nos cães, os mastocitomas com múltiplos nódulos cutâneos estão geralmente associados a uma baixa taxa de desenvolvimento de metástases e a um bom prognóstico (Osborne, 2007).

5.3. Apresentação clínica

O mastocitoma tem normalmente uma apresentação solitária, porém pode haver envolvimento multicêntrico em cerca de 11 a 14% dos casos (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009; Blackwood, 2011). Esta neoplasia pode ser classificada de acordo com a localização, a metastização e a presença de sinais clínicos (tabela 6).

Tabela 6: Classificação do grau clínico dos mastocitomas caninos segundo a OMS (García, 2012).

Grau	Características
Grau I	Tumor confinado à pele sem envolvimento dos linfonodos regionais
Grau II	Tumor confinado à pele com envolvimento dos linfonodos regionais
Grau III	Múltiplos tumores dérmicos ou um grande tumor infiltrado, com ou sem envolvimento dos linfonodos regionais
Grau IV	Qualquer tumor com metástases à distância
	a) Sinais paraneoplásicos ausentes
	b) Sinais paraneoplásicos presentes

As apresentações extracutâneas sem representação na pele são raras (García, 2012), dado que a derme e o tecido subcutâneo são os locais mais frequentes para o desenvolvimento desta neoplasia (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011; García, 2012). Cerca de 50 a 60% das lesões são encontradas no tronco, 25% nos membros e as restantes e menos frequentes

observam-se na cabeça e no pescoço (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011). As localizações menos habituais são a conjuntiva, as glândulas salivares, a nasofaringe, a laringe, a cavidade oral (North & Banks, 2009), o escroto, o períneo, o dorso e a cauda (Blackwood, 2011), assim como os ureteres, a coluna e o trato gastrointestinal (Thamm & Vail, 2007).

O mastocitoma visceral e sistémico está descrito, desenvolvendo-se quando há disseminação de uma neoplasia cutânea primária agressiva (Blackwood, 2011).

A aparência clínica do mastocitoma não permite estabelecer o seu grau de malignidade nem definir a sua evolução, uma vez que existem nódulos que se mantêm estáveis durante anos antes de se desenvolverem de forma rápida, e outros que se comportam de forma agressiva desde o início (García, 2012).

Os nódulos neoplásicos estão normalmente bem definidos e a presença de prurido é variável. Nalguns casos apresentam eritema, alopecia ou ulceração (García, 2012). Os doentes podem ainda apresentar tumefacção urticária ou edema difuso, podendo imitar celulite ou dermatite acral (Blackwood, 2011).

O mastocitoma pode-se apresentar em forma multinodular cutânea e, em casos avançados, pode crescer até mais de 30 cm de diâmetro ou aparecer como uma inflamação difusa com ampla extensão cutânea (García, 2012).

Os mastocitomas bem diferenciados tendem a ser solitários, com 1 a 4 cm de diâmetro, de crescimento lento, de consistência elástica e podem estar presentes sem evolução pelo menos durante 6 meses. Já os mastocitomas anaplásicos (pouco diferenciados) têm um crescimento rápido, atingem tamanhos grandes e podem ulcerar devido à irritação que causam, o tecido circundante pode estar inflamado e edematoso e pode haver desenvolvimento de pequenos nódulos satélite nos tecidos circundantes. As formas subcutâneas suaves e de consistência elástica à palpação podem ser mal diagnosticadas, uma vez que podem ser confundidas com lipomas (Thamm & Vail, 2007).

Uma particularidade desta neoplasia reside no facto de ser descrita por parte dos proprietários como “massas que aumentam e diminuem o seu tamanho de forma periódica” (García, 2012). Estas diferenças de tamanho observadas pelos donos são provocadas pelo edema e pela inflamação local devido à libertação de histamina e enzimas proteolíticas por parte do tumor. Este fenómeno é conhecido pelo sinal de Darier e é um fator importante no diagnóstico (North & Banks, 2009; García, 2012).

A mastocitose no cão é rara e só aparece em fases terminais da doença, caracterizando-se pela infiltração de mastócitos tumorais na maior parte dos tecidos, incluindo na medula óssea e no sangue periférico (García, 2012). Nesta fase os doentes podem apresentar linfadenomegalia, esplenomegália e hepatomegália, assim como derrames pleurais e peritoneais que podem conter

mastócitos neoplásicos. O envolvimento da medula óssea ocorre em cerca de metade dos casos de mastocitoma visceral (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009).

Após o tratamento com sucesso de um mastocitoma pode haver ocorrência de outros mastocitomas primários não relacionados entre si. Tal facto ocorre em cerca de 44% dos cães, sendo que 20% destes desenvolvem mais do que um nódulo, destacando-se esta ocorrência em raças como os Golden Retrievers, os Labrador Retrievers, os Weimaraners e os Boxers. Estes animais não têm menor sobrevida comparativamente com os que desenvolvem massas solitárias do mesmo grau de malignidade, uma vez que estas massas não são metástases, mas sim nódulos primários. As metástases cutâneas são normalmente observadas em mastocitomas de alto grau de malignidade, são múltiplas, de rápido crescimento e frequentemente estão ulceradas (Blackwood, 2011).

A presença de sinais sistémicos como estímulo iatotrópico é rara, porém podem verificar-se alterações gastrointestinais como vômito, anorexia, melena e dor abdominal, resultantes da desgranulação do mastocitoma ou de um mastocitoma intestinal primário (North & Banks, 2009).

5.4. Síndromes Paraneoplásicas

A libertação local ou sistémica de substâncias vasoativas armazenadas nos grânulos dos mastócitos da neoplasia leva ao desenvolvimento de síndromes paraneoplásicas, provocando um quadro mais grave e urgente que a presença do próprio tumor (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011; García, 2012).

As síndromes paraneoplásicas associadas ao mastocitoma são: - a ulceração local e o aumento de tamanho do nódulo neoplásico, devido a edema e inflamação local (North & Banks, 2009); - o atraso da cicatrização das feridas cirúrgicas com consequente ulceração (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009; García, 2012); - o prolongamento dos tempos de hemorragia devido à libertação de heparina, contudo raramente ocorrem coagulopatias sistémicas com alterações nos fatores de coagulação, a não ser que ocorra coagulação intravascular disseminada associada ao desenvolvimento tumoral (North & Banks, 2009; García, 2012); - o choque hipotensivo provocado pela desgranulação do mastocitoma na cirurgia (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009); - a ocorrência de úlceras gástricas localizadas na região antro pilórica e no duodeno proximal (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011; García, 2012), podendo ocorrer também colapso ou choque anafilático (Blackwood, 2011).

5.5. Diagnóstico

O diagnóstico de mastocitoma faz-se, na maioria dos casos, através de uma amostra citológica obtida por PAAF; contudo, a diferenciação do estadió apenas se consegue com a ajuda da histopatologia. De maneira a perceber a extensão da neoplasia e uma vez que pode ocorrer metastização à distância, é necessária a realização de exames complementares como o hemograma, as análises bioquímicas, a radiografia torácica e a ecografia abdominal.

5.5.1. Hemograma

O hemograma tem pouco significado clínico nos doentes que não têm sinais sistémicos, uma vez que, na maior parte dos casos, não são encontradas quaisquer alterações. Porém, no mastocitoma visceral pode ser observada a presença de eosinofilia ou basofilia periférica (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011).

5.5.2. Radiografia e Ecografia

A radiografia torácica, para além de permitir a exclusão de doenças concomitantes antes da realização do tratamento, permite observar a existência de metastização pulmonar, de linfadenopatia torácica ou de infiltrado intersticial (Blackwood, 2011).

Para a avaliação dos órgãos abdominais a ecografia é o método de eleição, uma vez que permite a observação de alterações na estrutura e dimensão dos órgãos, bem como hepato e esplenomegália (North & Banks, 2009).

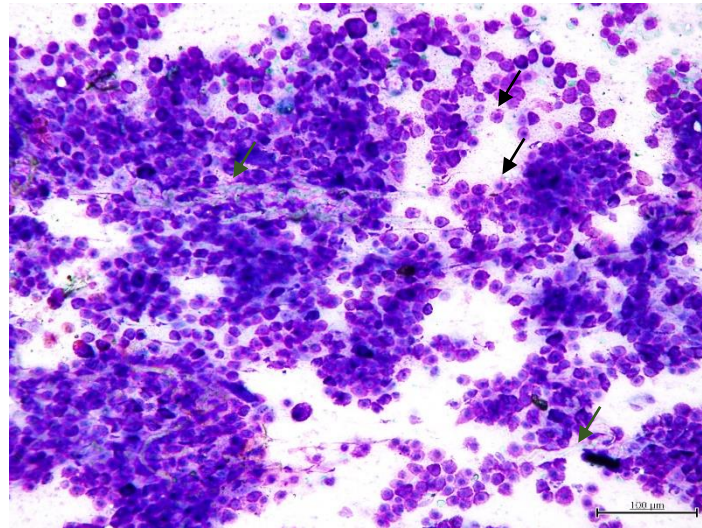
5.5.3. Citologia

Normalmente, a citologia obtida por PAAF é suficiente para o diagnóstico pré-cirúrgico desta neoplasia (North & Banks, 2009; García, 2012), uma vez que, permite diagnosticar corretamente entre 92 a 96% dos casos de mastocitomas. Contudo, o seu estadiamento não é possível apenas com a citologia, havendo assim necessidade de recorrer à histopatologia (Blackwood, 2011).

Em termos citológicos, os mastocitomas consistem predominantemente em mastócitos, que são células redondas ligeiramente maiores que os linfoblastos. As células são frágeis e normalmente apresentam grânulos livres (Thrall, 2007) intracitoplasmáticos ou extracelulares (caso haja rotura da célula), sendo esta a principal característica dos mastócitos malignos (North & Banks, 2009; García, 2012). No aspirado podem também ser observados eosinófilos e células mesenquimatosas, assim como colagénio degenerado (Thrall, 2007). A observação de células

tumorais de um infiltrado mais ou menos intenso de polimorfonucleares eosinófilos, pode também ser possível (García, 2012).

Figura 7: Microfotografia de esfregaço de mastocitoma (Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa).



Legenda: Na figura podemos observar inúmeros mastócitos neoplásicos bem diferenciados, tendo riqueza de granulações intracitoplasmáticas (seta preta), são também visíveis fibras de colagénio interpostas com as células neoplásicas (seta verde), possivelmente resultantes da colagenólise que pode ocorrer neste tipo de tumores, sendo um achado frequente no exame citológico. (Coloração Giemsa. Barra 100µm).

5.5.4. Histopatologia

A histopatologia obtida a partir da biópsia da neoplasia é necessária para confirmar o diagnóstico, para determinar o grau clínico e para obter informações adicionais, como por exemplo, verificar se os bordos cirúrgicos são livres de células neoplásicas (García, 2012).

O mastocitoma corresponde a uma proliferação neoplásica constituída por células redondas ou cubóides de bordos normalmente bem definidos, que cresce com um padrão difuso e trabecular na derme (García, 2012).

Existem três graus histológicos de malignidade, designados como Sistema de Patnaik (tabela 7) (García, 2012).

Tabela 7: Graus histológicos de malignidade, designados como Sistema de Patnaik (Adaptado de García, 2012).

Grau	Características
Grau I (baixo grau)	Mastócitos maduros e bem diferenciados, que se manifestam pela presença de grande quantidade de granulações intracitoplasmáticas em quase todas as células tumorais.
Grau II (grau intermédio)	Células de diferenciação moderada e menor número de mastócitos com granulações, sendo escassas as figuras de mitose.
Grau III (alto grau ou anaplásico)	Células pouco diferenciadas, pleomórficas e de alto índice mitótico, sendo escassas ou ocasionais as células que mantêm ainda granulações citoplasmáticas.

Recentemente, um documento de consenso europeu sobre mastocitomas em cães e gatos declarou a existência de um mau prognóstico associado à confirmação de metástases nos linfonodos, declarando ainda que o sistema de classificação utilizado (sistema de Patnaik) era um desafio. Assim, Weishaar, Thamm, Worley & Kamstock (2014) classificaram os linfonodos metastizados de acordo com um novo sistema de classificação (HN0-HN3; HN representa linfonodos) (tabela 8), baseada no número, na distribuição, na arquitetura e nos nódulos de mastócitos (Weishaar *et al*, 2014).

Tabela 8: Novo sistema de classificação para avaliação microscópica de metástases nos linfonodos em cães com mastocitoma (Adaptada de Weishaar *et al*, 2014).

Classificação	Critério histopatológico	Interpretação proposta
HN0	Zero a três mastócitos (0-3) dispersos, isolados em seios (subcapsular, paracortical ou medular) e/ou parênquima por campo x400, ou não preenche os critérios de qualquer outra classificação abaixo.	Sem metástases
HN1	Mais de três seios de mastócitos isolados (subcapsular, paracortical ou medular) e/ou parênquima com no mínimo de 4 num campo de x400.	Pré-metastático
HN2	Agregados de mastócitos (≥ 3 células associadas) em seios (subcapsular, paracortical ou medular) e/ou camadas parênquimatosas ou sinusoidais de mastócitos.	Metástases iniciais
HN3	Interrupção ou apagamento da arquitetura normal dos linfonodos por focos discretos, nódulos, camadas ou massas declaradas compostas por mastócitos.	Metástases evidentes

5.6. Tratamento

O tratamento pode ser realizado através de várias metodologias de acordo com o estadió e com o prognóstico da doença (North & Banks, 2009).

5.6.1. Cirurgia

A cirurgia é o tratamento de eleição dos mastocitomas localizados na pele ou no tecido subcutâneo, sempre que seja possível a correta exérese do ou dos nódulos diagnosticados. Contudo, nas extremidades distais e no focinho está indicada a realização de terapêutica adjuvante, devido à difícil abordagem cirúrgica (North & Banks, 2009).

Na presença de nódulos muito grandes e de difícil exérese cirúrgica é por vezes necessária a realização prévia de radio ou de quimioterapia com o propósito de promover a sua remoção antes da cirurgia. Deverá ser evitada a administração de corticosteróides, uma vez que podem conduzir à subestimação do tamanho do nódulo e consequentemente levar a uma exérese incompleta (North & Banks, 2009).

A recomendação padrão para a exérese cirúrgica de mastocitomas, implica uma margem cirúrgica de 3 cm lateralmente e em profundidade. Contudo, existem estudos que comprovam

que, em tumores com diâmetro menor a 5 cm ou de grau histopatológico I e II, apenas é necessária uma margem de 2 cm lateralmente e de 3 cm em profundidade (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009; Blackwood, 2011; García, 2012). Blackwood (2011) refere ainda que há estudos que mostram não ser necessária a remoção de margens nos mastocitomas de grau I e II se os nódulos não forem superiores a 5 cm de diâmetro. Já Thamm & Vail (2007) referem que 30% dos doentes com mastocitomas de grau I e II têm recorrência da neoplasia quando as margens não são respeitadas.

No caso de o nódulo estar presente nas extremidades distais, a amputação é uma opção, sendo nalguns casos o tratamento de escolha, principalmente se a neoplasia se estender 360° à volta do carpo ou do tarso (North & Banks, 2009). Porém, se a neoplasia for de grau I ou II pode ser considerada a associação da cirurgia com a radioterapia e com ou sem quimioterapia adjuvante, ou apenas radioterapia combinada ou não com quimioterapia (Thamm & Vail, 2007).

Devido à necessidade de remoção de margens amplas, é por vezes necessária a realização de enxertos cutâneos. No caso de haver recorrência e se as margens não tiverem sido respeitadas, a radioterapia terá de incidir em todo o enxerto e não apenas no local do mastocitoma primário, uma vez que se deve assumir uma potencial recorrência em qualquer região do enxerto. Assim, se houver alguma dificuldade por parte do cirurgião na realização do enxerto cutâneo, é preferível a realização da excisão sem as margens corretas, seguido de terapêutica adjuvante (North & Banks, 2009).

5.6.2. Crioterapia

A criocirurgia é o uso controlado do frio para induzir a morte celular. Contudo, nos mastocitomas de grandes dimensões não deve ser utilizada esta técnica, pois a rápida desgranulação celular e a consequente libertação de histamina, heparina e outras substâncias vasoativas, podem induzir choque hipotensivo. Os mastocitomas pequenos (<1cm) podem ser submetidos a este tratamento, com desenvolvimento de resposta local marcada (Withrow, Paulson & Lucroy, 2007).

5.6.3. Radioterapia

No tratamento dos mastocitomas, a radioterapia é maioritariamente uma terapêutica adjuvante à cirurgia (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011). Esta deve ser considerada sempre que não tenham sido respeitadas as margens cirúrgicas ou, no caso de recidiva, quando não é possível uma segunda abordagem cirúrgica, o que ocorre maioritariamente em mastocitomas localizados na cabeça, nos músculos do focinho e nas extremidades distais dos membros. Qualquer

mastocitoma que mostre invasão dos tendões deve ser irradiado, independentemente do grau de malignidade (North & Banks, 2009).

Devido à possibilidade de desenvolvimento de efeitos secundários a longo prazo, deve-se evitar a implementação deste tratamento em doentes jovens (North & Banks, 2009). Também no que respeita aos mastocitomas de grandes dimensões, a radioterapia deve ser evitada como tratamento único, uma vez que provoca efeitos secundários sistémicos graves (tendo já sido reportadas mortes), consequência da desgranulação dos mastócitos (Blackwood, 2011).

Embora o protocolo ideal não seja ainda conhecido, existem vários protocolos de radioterapia disponíveis. A aplicação de todos estes em mastocitomas de grau de malignidade I e II têm um prognóstico favorável, apresentando os animais uma sobrevida média de 2 anos. Nos mastocitomas muito diferenciados há regressão do tumor primário, mas os doentes acabam por morrer devido às metástases (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011).

5.6.4. Quimioterapia

A quimioterapia está indicada em doentes com metástases ou com mastocitomas cutâneos múltiplos, nos quais a cirurgia e a radioterapia não são opção (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011). Os fármacos usados incluem a prednisolona, a L-asparaginase, a doxorrubicina, a vincristina, a ciclofosfamida, o clorambucilo, a hidroxiureia, a vimblastina e a lomustina ou a combinação destes (North & Banks, 2009).

O objetivo da quimioterapia no controlo do mastocitoma consiste na eliminação das células malignas quando não há possibilidade de implementação de terapêutica radioterápica ou de uma re-intervenção cirúrgica, no melhor prognóstico pós-cirúrgico nos mastocitomas de grau de malignidade III, e no controlo das metástases ou dos sinais sistémicos (García, 2012).

A quimioterapia pré-cirúrgica ou antes da radioterapia consolida a neoplasia e melhora assim a probabilidade de uma abordagem cirúrgica correta (Blackwood, 2011).

5.6.4.1. Prednisolona

O tratamento com prednisolona tem uma resposta inicial positiva por parte dos doentes, podendo estes atingir a remissão completa, contudo os tempos de remissão e de vida são frequentemente muito curtos (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009; García, 2012). Assim a prednisolona não é recomendada como tratamento único, a não ser que os outros tratamentos sejam recusados pelos proprietários. O tratamento com prednisolona é instituído durante 6 semanas, com o desmame apropriado (North & Banks, 2009).

5.6.4.2. Vimblastina e prednisolona

Na terapêutica com vimblastina e prednisolona (tabela 9) os doentes com mastocitomas de alto grau de malignidade, têm uma sobrevida média de 331 dias e cerca de 45% destes têm 1 a 2 anos de vida (García, 2012).

Tabela 9: Protocolo da combinação de vimblastina e prednisolona (North & Banks, 2009).

Fármacos	Semanas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Vimblastina 2 mg/m ² IV	●	●	●	●		●		●		●		●
Prednisolona, 2 mg/kg PO SID	●											
Prednisolona, 1,5 mg/kg PO SID		●										
Prednisolona 1 mg/kg PO QUOD			●	●								

5.6.4.3. Lomustina

A lomustina e a vimblastina são o tratamento de manutenção para os mastocitomas metastáticos e múltiplos cutâneos (North & Banks, 2009). Na experiência de North & Banks (2009), a utilização de lomustina (60 mg/m²) a cada 3 semanas e durante 3 tratamentos é eficaz nos doentes com metástases regionais de um mastocitoma de grau de malignidade II. Já nos mastocitomas de grau III, é aconselhado o uso alternativo de lomustina (60 mg/m²) e vimblastina (2 mg/m² IV) com intervalos de 2 a 3 semanas.

Na administração de lomustina como tratamento único no mastocitoma de grau III, sem intervenção cirúrgica, observa-se uma sobrevivência de 2 meses (García, 2012).

5.6.5. Tratamento intralesional

De forma a prevenir a recorrência da neoplasia após a sua remoção cirúrgica, pode-se recorrer ao tratamento intralesional com água deionizada. Este tratamento, embora seja controverso, tem como objetivo a indução da desgranulação dos mastócitos (North & Banks, 2009; García, 2012). A mesma pode também ser realizada através da administração local de corticosteróides,

como a triancinolona numa dose de 1 mg/cm de diâmetro tumoral a cada 2 semanas (García, 2012).

Outro tratamento intralesional a considerar é a braquiterapia, o qual consiste na colocação de implantes radioativos na lesão (Blackwood, 2011).

5.6.6. Inibidores da tirosina cinase (TKI)

As tirosinas cinase são proteínas responsáveis pela fosforilação de substratos proteicos e pela transmissão de sinais do ambiente extracelular para o interior da célula. Estas transmitem sinais intencionais e controlam a expressão genética, promovendo o crescimento, a sobrevivência, a angiogénese e a motilidade. A ativação destas proteínas confere alterações conformacionais associadas à fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio da cinase, que por sua vez ativam parceiros de sinalização a jusante numa reação de cascata em cadeia (Helfand, 2011).

A ativação dos recetores da tirosina-cinase ocorre devido a mutações genéticas no gene c-kit, está associada ao desenvolvimento do mastocitoma canino e resulta num aumento do seu ligando independentemente da proliferação celular, das alterações na migração e na maturação, e das características de sobrevivência (Blackwood, 2011).

O c-kit é um protooncogénico tipo III da proteína cinase e é um recetor do fator das células estaminais. É uma citocina que regula funções importantes do mastocitoma como o crescimento, a diferenciação, a proliferação e a desgranulação (Patrino *et al*, 2014). Cerca de 15 a 40% dos mastocitomas caninos apresentam uma mutação no gene c-kit, que se encontra maioritariamente em tumores de alto grau de malignidade, estando assim relacionada com um mau prognóstico (Blackwood, 2011; Takeuchi *et al*, 2013).

Face a este conhecimento desenvolveram-se fármacos inibidores da tirosina-cinase que bloqueiam especificamente a fosforilação KIT (Helfand, 2011). Os TKI que têm mais efeito nos mastocitomas com mutações c-kit são o mesilato de masitinib, o fosfato de toceranib (Blackwood, 2011) e o imatinib (García, 2011).

O masitinib é um inibidor da tirosina-cinase que, *in vitro*, inibe de forma potente e seletiva a mutação da região justa membranosa e a região não mutada do recetor c-kit, inibindo também o recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas e o recetor do fator de crescimento fibroblástico. A dose recomendada é 12,5 mg/kg SID PO (García, 2012). O masitinib atrasa o crescimento das neoplasias e melhora o tempo de sobrevivência nos mastocitoma de grau II e III (Helfand, 2011).

O tratamento com toceranib, em animais com mutação do c-kit, provou parar o crescimento tumoral e induzir a remissão clínica (Helfand, 2011).

O toceranib e o masitinib têm sido usados sem manifestação clínica de grande toxicidade, os estudos controle demonstraram uma resposta tumoral (toceranib), um atraso da progressão e um aumento da sobrevida (masinib e toceranib) em mastocitomas de grau II e III (Blackwood, 2011).

5.6.7. Eletroquimioterapia

A eletroquimioterapia é um tratamento novo que combina impulsos elétricos, curtos e intensos, com fármacos que não penetram nas células por difusão simples através da membrana celular de forma a permeabilizar a célula (García, 2012). O tratamento combina séries de impulsos adequados com a administração local de quimioterapia, como por exemplo, a administração de bleomicina ($1,5 \text{ UI/cm}^2$) seguida da aplicação de impulsos bifásicos (8 pulsos de 1.300 V/cm , $50+50 \text{ }\mu\text{s}$ de duração e 1 Hz de frequência) (García, 2012). A taxa de resposta é de 85% e o tempo de recorrência é de 40 a 65 meses (North & Banks, 2009; García, 2012).

5.6.8. Reovírus oncolítico

Hwang *et al* (2013) reportaram os efeitos do reovírus no mastocitoma canino e demonstraram que as linhagens das células do mastocitoma são suscetíveis à citotoxicidade induzida pelo reovírus *in vitro*, existindo alta produção e replicação viral e indução de morte celular. Nos estudos *in vivo* em modelos de xenotransplantes foi observada uma redução da massa tumoral com um único tratamento. Embora não tenham sido observados efeitos secundários, observou-se que os mastócitos derivados da medula óssea canina e murina foram também afetados pelo reovírus (Hwang *et al*, 2013).

5.6.9. Tratamento local com interleucina 2 (IL-2)

A injeção local de IL-2 inibe o fluxo sanguíneo da neoplasia, induzindo assim morte celular através da falta de oxigênio e nutrientes nas células tumorais. Contudo, este tratamento é relativamente lento, uma vez que o processo imunitário e, em particular o fagocitário, requerem tempo para a regressão tumoral que poderá levar até 6 meses. O tratamento consiste na injeção local de $4,5 \times 10^6$ unidades de IL-2 humana recombinante em $0,25 \text{ ml}$ de solução na neoplasia primária (Ziekman *et al*, 2013).

5.7. Reavaliação após remissão total

Após remissão total da neoplasia, deve-se reavaliar o doente periodicamente, ou seja, 1 mês após o tratamento, depois de 3 em 3 meses durante 1 ano e meio e a partir daí a cada 6 meses. Em cada reavaliação deverá ser observado o local da neoplasia primária e o linfonodo regional, deverá ser realizado um exame físico completo e caso necessário deverá ser efetuada PAAF dos novos nódulos cutâneos (Thamm & Vail, 2007).

5.8. Prognóstico

O prognóstico dos mastocitomas depende de uma série de fatores como o grau histopatológico, a localização do tumor, o estadió clínico, a taxa de proliferação celular, a taxa de crescimento, a recorrência, a raça e a mutação do c-kit (Blackwood, 2011; García, 2012).

O grau histopatológico é o fator mais importante de prognóstico, uma vez que está relacionado com a sobrevida (Blackwood, 2011; García, 2012). Os tumores anaplásicos (grau III) apresentam maior potencial metastático e uma tendência maior para disseminação sistêmica, podendo ocorrer mastocitose. Os tumores de baixo grau de malignidade (grau I) tendem a ser estáveis e de progressão lenta, podendo mesmo manter-se estáveis durante várias semanas, meses ou mesmo anos antes de entrarem na fase de crescimento rápido (North & Banks, 2009). Os mastocitomas de grau I, que correspondem a cerca de 36% dos casos, têm melhor prognóstico, nestes 94% dos animais sobrevivem durante 5 anos e apenas 25% têm recidiva, a sobrevida destes doentes é 2 vezes superior do que os de grau II e 6 vezes maior do que os de grau III. Já os mastocitomas de grau II, que correspondem a 43% dos casos, têm uma taxa de recidiva de 44% e cerca de 40% dos doentes conseguem viver 5 anos. Os mastocitomas de grau III, que correspondem a 20% dos casos são os de pior prognóstico, uma vez que 76% destes têm recidiva e apenas 6% conseguem sobreviver 5 anos (García, 2012).

Observou-se que os doentes com mastocitomas de alto grau de malignidade (classificação histológica de Kiel) desenvolveram metástases mais rapidamente e tiveram uma sobrevida inferior ao dos animais com mastocitomas de baixo grau de malignidade (Takeuchi *et al*, 2013). Também os animais com o grau HN2/3 (classificação histológica de Weishaar) tiveram pior prognóstico que os HN0/1 (Weishaar *et al*, 2013).

Quanto à localização da neoplasia, sabe-se que mastocitomas da região perineal, inguinal, escrotal e prepucial têm frequentemente um comportamento mais agressivo do que seria de esperar de acordo com o seu grau histológico, fazendo assim com que o tempo de remissão seja mais curto e haja menor sobrevida (Thamm & Vail, 2007; García, 2012). Contudo, há autores que pensam que a localização cutânea não tem influência no prognóstico (García, 2012). Os mastocitomas no pavilhão auricular, subungueal, perianal, oral e outras regiões mucocutâneas

estão associados a tumores histologicamente mais indiferenciados e assim a um mau prognóstico, com ocorrência de metástases. Por esta razão, considera-se qualquer mastocitoma mucocutâneo como um mastocitoma de grau III (North & Banks, 2009).

Relativamente ao estadio clínico, os doentes que se apresentam no estadio I têm melhor prognóstico que os que apresentam um estadio III e IV da doença (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009), assim como os animais que não apresentam sinais clínicos (Blackwood, 2011). A avaliação da taxa de proliferação celular é importante no prognóstico pós-cirúrgico, uma vez que quanto maior o índice mitótico, a frequência relativa de AgNORs e a percentagem de PCNAs, Ki-67 imunopositivo e BrdU, pior é o prognóstico (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009).

A recorrência local após excisão cirúrgica pode ter um prognóstico mais reservado (Thamm & Vail, 2007).

Relativamente à raça, observou-se que os Boxers têm normalmente neoplasias bem diferenciadas e por isso de melhor prognóstico (North & Banks, 2009; García, 2012). Existem raças que têm predisposição para o desenvolvimento de mastocitomas mais agressivos, como o Boieiro de Berna, o Sharpei e o Bull Mastiff. Mastocitomas múltiplos cutâneos são frequentemente observados em Boxers, Golden Retrievers, Labradores Retrievers e Weimaraners (North & Banks, 2009).

Os animais com mutações no c-kit têm menor sobrevida (Marconato *et al*, 2014), uma vez que a região justamembranária do c-kit pode estar associada a um pior prognóstico (Thamm & Vail, 2007). Takeuchi *et al* (2013) observaram que a presença de duplicações internas de tandem no exão 11 do gene c-kit estava associada a menor tempo de remissão. Em geral, a duplicação tandem interna está associada a um aumento do risco de metástases e de recorrência local, a um aumento do índice de proliferação tumoral e à localização aberrante de KIT (Marconato *et al*, 2014).

Capítulo III - Trabalho Experimental

1. Introdução

Como referido anteriormente, o linfoma e o mastocitoma são neoplasias malignas que podem afetar os nossos animais de companhia e que se encontram entre as neoplasias mais prevalentes na casuística do Hospital Escolar da FMV, a qual foi utilizada para a realização do trabalho que agora se apresenta.

Um dos aspectos mais importantes para a decisão da melhor terapêutica a aplicar por parte do médico veterinário ao doente oncológico é o prognóstico, sendo este também de elevada importância para os proprietários, tanto a nível do maneio do seu animal como a nível sentimental.

O prognóstico do linfoma e do mastocitoma é influenciado por diversos fatores. Contudo, para a avaliação destes parâmetros e dos marcadores de prognóstico, até agora disponíveis, é necessária a realização de exames complementares adicionais, aos quais estão associadas demoras e custos, muitas vezes avultados para os proprietários. Importa assim perceber se existem outros marcadores de prognóstico de fácil e rápida realização que permitam ajudar o médico veterinário nas suas decisões clínicas.

Por outro lado, existem evidências da participação do stress oxidativo no desenvolvimento neoplásico, uma vez que há indução de mutações genéticas, de lesão do ADN, de instabilidade do genoma, de proliferação celular, de aumento do tempo de vida e da migração celular. Com o aumento do stress oxidativo celular observa-se, consequentemente, uma diminuição da atividade dos antioxidantes na circulação sanguínea.

Considerando as propriedades antioxidantes da PON1, as evidências de uma diminuição de antioxidantes na presença de neoplasias e o facto de não haver conhecimento de estudos que relacionem esta enzima com a doença neoplásica em Medicina Veterinária, desenvolveu-se o trabalho agora apresentado, no qual se realizou a avaliação da atividade da PON1 em cães com linfoma e em cães com mastocitoma, visando assim contribuir para o estudo da sua utilização como eventual marcador ou fator de prognóstico nestas neoplasias caninas.

Assim os objetivos particulares deste trabalho foram:

- Avaliar os valores da atividade da PON1 em animais com linfoma ou mastocitoma e compará-los com os valores apresentados por um grupo de animais saudáveis, para observar se existem diferenças estatisticamente significativas entre estes três grupos;
- Avaliar se nos doentes oncológicos, com linfoma ou mastocitoma, os valores da atividade da PON1 apresentam variações estatisticamente significativas em função de determinadas

características apresentadas pelos animais, nomeadamente idade, género e estado geral de cada animal;

- Avaliar a possibilidade de estabelecer um valor de “cut off” para a atividade da PON1 que permita distinguir os animais controlo dos animais oncológicos, considerando as duas neoplasias em conjunto ou os doentes com linfoma isoladamente;
- Determinar o valor prognóstico da atividade da PON1, através da relação entre os valores da enzima e o tempo de sobrevivência, dos doentes oncológicos como um todo e, dos doentes com linfoma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Animais

Neste estudo foram avaliados quarenta e oito animais, pertencentes à espécie *Canis lupus familiaris*. Destes, vinte e quatro pertenciam ao grupo controlo e os restantes ao grupo de doentes oncológicos estudados: oito com linfoma e dezasseis com mastocitoma. Os doentes oncológicos foram selecionados após a sua apresentação à consulta de oncologia no Hospital Escolar da FMV e apenas um animal proveio de outro CAMV (Centro de Atendimento Médico Veterinário). Os animais do grupo controlo foram selecionados a partir da sua apresentação em consultas de rotina ou para cirurgias eletivas.

Critérios de inclusão: No grupo de doentes oncológicos estudado não houve exigência de raça, idade ou género e foram incluídos animais com diagnóstico de linfoma ou mastocitoma após a realização de Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) ou biópsia incisional ou excisional. Foram incluídos animais com diferentes graus de malignidade da neoplasia (alto ou baixo), bem como animais com presença ou ausência de metástases ou de sinais clínicos sistémicos da doença. O grupo controlo foi constituído por animais clinicamente saudáveis representativos do grupo de estudo, ou seja, da mesma raça e de idade aproximada.

Critérios de exclusão: Foram excluídos todos os animais com diagnóstico de qualquer outro tipo de neoplasia em simultâneo ou anteriormente ao diagnóstico, assim como os que receberam terapêutica antineoplásica anteriormente à colheita das amostras.

2.1.2. Reagentes e outro material

Os reagentes necessários para a realização da determinação analítica da atividade da PON1 foram o CaCl_2 , a Trizma HCl, a Trizma base, o acetato de p-nitrofenilo e de p-nitrofenol, que são reagentes de grau analítico adquiridos à SIGMA Portugal.

A absorvância resultante da formação de p-nitrofenol foi determinada no espectrofotómetro SpectraMAX 340.

2.2. Métodos

2.2.1. Diagnóstico e estadiamento das neoplasias

Todos os animais com suspeita de neoplasia foram submetidos à realização de PAAF e apenas dois doentes foram submetidos a biópsia, uma vez que a PAAF não permitiu obter um diagnóstico definitivo.

Para o estadiamento das neoplasias, realizaram-se análises e exames complementares, nomeadamente hemograma, análises bioquímicas, radiografia torácica e abdominal e ainda ecografia abdominal.

2.2.2. Colheita e armazenamento de amostras biológicas

Em ato de consulta e com o consentimento prévio dos proprietários, para além da colheita regular de sangue para avaliar o estado geral do doente, foi realizada a colheita de uma outra amostra de sangue para a avaliação dos níveis de atividade da PON1. Esta colheita, de 0,5 a 1 ml de sangue, foi realizada através da punção de uma veia periférica e o sangue foi colocado num tubo seco.

Após a colheita, a amostra foi armazenada durante 30 minutos a temperatura de refrigeração (2 a 8°C), centrifugada durante oito minutos a 1100 x g e, em seguida, o soro foi armazenado a uma temperatura de congelação de -80°C.

2.2.3. Doseamento da atividade da PON 1

A atividade da PON1 sérica foi avaliada por espectrofotometria usando a metodologia descrita por Tvarijonaviciute *et al* (2012), adaptada às condições laboratoriais disponíveis.

Resumidamente, foram utilizados 5 a 10 µl das amostras de soro, que foram incubadas a 37°C com tampão 1 mM CaCl_2 e 50 mM Trizma HCl/Trizma Base, pH 8,0 e solução de acetato p-nitrofenilo 2,2 mM. A produção de p-nitrofenol resultante da ação da PON1 foi monitorizada no espectrofotómetro durante 6 minutos e a atividade da PON1 foi calculada usando a curva de

calibração de p-nitrofenol e expressa em Unidades por unidade de volume (U/ml), no qual 1 Unidade representa 1 μ mol de p-nitrofenol formado por minuto.

2.2.4. Exames Complementares

Para o estadiamento das neoplasias e a avaliação do estado geral, alguns doentes realizaram hemogramas, análises bioquímicas séricas, radiografias torácicas, radiografias abdominais e ecografias abdominais.

A confirmação de diagnóstico foi obtida após análise citológica ou histológica da amostra colhida por PAAF ou por biópsia.

2.2.5. Estado clínico

A avaliação do estado clínico dos animais incluiu uma anamnese cuidada, de modo a detetar sintomatologia do foro gastrointestinal (inapetência, vômito e diarreia) e, a realização de um exame físico pormenorizado.

2.2.6. Parâmetros em estudo

O principal parâmetro em estudo é a atividade da PON1 que, neste caso, reflete a atividade antioxidante de animais com doença neoplásica. A atividade da PON1 foi avaliada nos diferentes grupos de estudo constituídos, sendo que, em função do objetivo e face ao pequeno número de animais que se apresentaram com linfoma, nalgumas situações os grupos de estudo foram dois: animais controlo e animais oncológicos, e noutras foram três: animais controlo, animais com linfoma e animais com mastocitoma.

Os valores da atividade da PON1 apresentados pelos animais incluídos em cada um dos grupos anteriores, foram comparados entre si de forma a avaliar a significância das suas diferenças, foram analisados em função de determinados parâmetros como a idade, o género e o estado geral do animal e foram utilizados para calcular os valores de “cut-off” que permitem diferenciar os animais do grupo controlo dos animais do grupo de doentes oncológicos e os animais do grupo controlo dos animais com linfoma.

O tempo de sobrevivência foi também determinado para os dois grupos de animais com tumores, sendo que este parâmetro poderá ser utilizado como marcador de prognóstico (tabela 14 no Anexo).

2.2.7. Análise estatística dos dados

O registo dos dados relativos aos animais com doença oncológica e aos animais do grupo controlo foi realizado em software Microsoft Office Excel 2010, enquanto a análise dos resultados foi realizada com o auxílio do programa R – versão 3.1.2 (2015-01-12).

O teste Shapiro-Wilk foi aplicado de forma a avaliar a normalidade das amostras populacionais estudadas. Se a normalidade não se verificasse, utilizava-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *a posteriori* de Tukey, por forma a comparar os grupos (grupo controlo, grupo linfoma e grupo mastocitoma) dois a dois, considerando que o grupo de animais oncológicos foi dividido, em dois, em função da neoplasia diagnosticada. O teste de Wilcoxon utilizou-se para avaliar a diferença dos valores médios da atividade da PON1 em função das variáveis acima referidas (idade, animais com menos de 10 anos e com 10 anos ou mais e, animais com e sem alterações a nível do trato gastrointestinal, do hemograma, das análises bioquímicas, das radiografias torácicas e abdominais e das ecografias abdominais) considerando neste caso apenas o grupo controlo e o grupo de animais oncológicos sem considerar o tipo de neoplasia de cada animal.

A Característica de Operação do Recetor, ou curva ROC (do inglês: “Receiver Operating Characteristic”), foi utilizada de forma a obter uma representação gráfica que permita estabelecer a relação entre a sensibilidade e a especificidade do teste de diagnóstico quantitativo. Esta curva foi utilizada com o objetivo de determinar o valor ótimo de compromisso entre estes dois parâmetros e estabelecer o respetivo valor de “Cut off” para diferenciar os animais do grupo controlo dos animais do grupo de doentes oncológicos e, os animais do grupo controlo dos animais com linfoma, com base nos valores de atividade da PON1. A determinação do “Cut-off” permitiu classificar os animais em dois grupos, “Alto” (valores de atividade da PON1 superiores a 1 U/ml) e “Baixo” (valores de atividade da PON1 iguais ou inferiores a 1 U/ml), de acordo com o valor de PON1 no momento da colheita. O tempo de sobrevivência dos doentes, segundo esta classificação, foi estimado utilizando a função de Kaplan-Meier. Por último, o teste da família G-rho de Harrington & Fleming (1982) permitiu identificar se existiram diferenças significativas entre as curvas de sobrevivência.

Todos os testes estatísticos tiveram um intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados

3.1. Caracterização do grupo de doentes oncológicos e do grupo controlo

O grupo de teste incluiu 24 animais, dos quais 8 tiveram diagnóstico de linfoma e 16 de mastocitoma. No grupo controlo foram também incluídos 24 animais. As características destes dois grupos, no que respeita à raça, género e idade (em anos), são apresentadas na tabela 10.

Tabela 10: Características do grupo de doentes oncológicos e do grupo controlo.

Doentes oncológicos				Grupo controlo		
Neoplasia	Idade	Género	Raça	Idade	Género	Raça
Linfoma	17	Fêmea	Indefinida	1	Fêmea	Dogue Alemão
Linfoma	8	Macho	Rottweiler	6	Fêmea	Labrador
Linfoma	8	Macho	Indefinida	7	Macho	Labrador
Linfoma	2	Fêmea	Dogue Alemão	6	Macho	Labrador
Linfoma	7	Macho	Pointer	3	Macho	Boxer
Linfoma	6	Macho	West Highland	9	Fêmea	Golden Retriever
Linfoma	7	Macho	Indefinida	12	Macho	Golden Retriever
Linfoma	9	Macho	Indefinida	2	Macho	Labrador
Mastocitoma	10	Fêmea	Indefinida	15	Fêmea	Indefinido
Mastocitoma	8	Macho	Golden Retriever	10	Macho	Indefinido
Mastocitoma	8	Macho	Labrador	6	Macho	Indefinida
Mastocitoma	16	Fêmea	Indefinida	10	Macho	Labrador
Mastocitoma	11	Fêmea	Labrador	5	Macho	Rottweiler
Mastocitoma	2	Fêmea	Boxer	5	Fêmea	Bulldog Francês
Mastocitoma	10	Fêmea	Golden Retriever	1	Fêmea	Boxer
Mastocitoma	5	Fêmea	Labrador	3	Macho	Golden Retriever
Mastocitoma	6	Macho	Labrador	10	Fêmea	Indefinida
Mastocitoma	11	Fêmea	Indefinida	7	Macho	Indefinida
Mastocitoma	14	Macho	Golden Retriever	2	Macho	West Highland
Mastocitoma	4	Macho	Boxer	10	Macho	Indefinida
Mastocitoma	14	Fêmea	Indefinida	12	Fêmea	Indefinida
Mastocitoma	8	Fêmea	Labrador	2	Fêmea	Indefinida
Mastocitoma	5	Macho	Boxer	2	Macho	Boxer
Mastocitoma	5	Macho	Buldogue Francês	6	Fêmea	Pointer

A média e a mediana da idade dos animais do grupo de doentes oncológicos foi de 8 anos, tendo o animal mais novo 2 anos e o mais velho 17 anos. Quanto ao género, destes animais 12 eram fêmeas e os restantes eram machos. Já no grupo de animais de controlo a média e a mediana das idades foi de 6 anos, dos quais o mais novo tinha um 1 de idade e o mais velho 15.

O grupo de animais doentes oncológicos e o grupo de animais saudáveis apresentaram animais da mesma raça, assim cada grupo teve animais sem raça definida (n=8), Rottweiler (n=1), West Highland White Terrier (n=1), Dogue Alemão (n=1), Pointer (n=1), Bulldog Francês (n=1), Labrador (n=5), Boxer (n=3) e Golden Retriever (n=3).

3.2. Valores de PON1 nos diferentes grupos

Os resultados individuais obtidos para a atividade da PON1 encontram-se em anexo (tabela 14 e na tabela 15).

Foi realizada a análise descritiva destes valores considerando dois grupos: animais controlo e animais oncológicos. Assim, a atividade da PON1 no grupo de animais de controlo apresentou uma média de 1,205 U/ml [desvio padrão (dp) \pm 0,176 U/ml] e no grupo de doentes oncológicos de 0,984 U/ml (dp \pm 0,330 U/ml).

A avaliação da normalidade, realizada pelo teste de Shaphiro-Wilk, indicou que a amostra populacional estudada não tinha uma distribuição normal para a atividade da PON1 ($p = 0,004$). Separando-se o grupo de animais doentes oncológicos em dois, considerando o tipo de neoplasia apresentado, a média do valor da atividade da PON1 nos animais com linfoma (0,702 U/ml) foi, aproximadamente, metade da média apresentada pelos animais dos dois outros grupos, uma vez que, o grupo de controlo e o grupo de mastocitoma não apresentaram médias (1,205 e 1,125 U/ml, respetivamente) muito diferentes entre si (tabela 11 e gráfico 1).

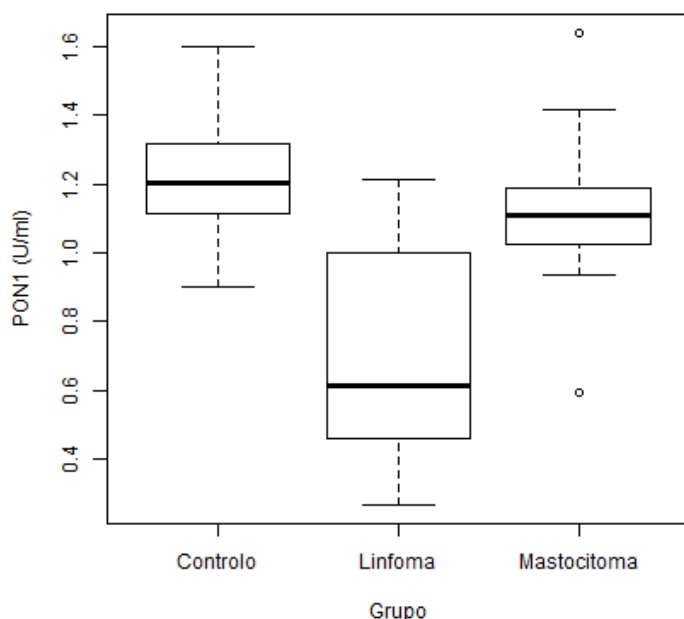
Nos diferentes grupos a dispersão de valores variou bastante, uma vez que o desvio padrão no grupo de linfoma foi 0,338 U/ml, no grupo de mastocitoma foi 0,225 U/ml e no grupo controlo foi 0,176 U/ml. Embora o grupo controlo não tenha apresentado grande variabilidade, tendo como mínimo um valor de atividade da PON1 de 0,899 U/ml e um máximo de 1,602 U/ml, o grupo de animais com linfoma apresentou bastante variabilidade, com um mínimo de valor de atividade da PON1 de 0,265 U/ml e um máximo de 1,213 U/ml, assim como o grupo do mastocitoma no qual se observou um valor de PON1 mínimo de 0,593 U/ml e um máximo de 1,642 U/ml.

Tabela 11: Estatística descritiva dos três grupos estudados.

Grupo	Média	DP	IQR	Mínimo	25%	Mediana	75%	Máximo
Controlo	1,205	0,176	0,188	0,899	1,112	1,201	1,301	1,602
Linfoma	0,702	0,338	0,467	0,265	0,469	0,613	0,936	1,213
Mastocitoma	1,125	0,225	0,139	0,593	1,042	1,111	1,180	1,642

Legenda: DP = Desvio Padrão; IQR = Intervalo Interquartil

Gráfico 1: Distribuição dos valores dos três grupos estudados.



Considerando os três grupos de estudo já referidos observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os valores de atividade da PON1 entre os três grupos de animais ($p=0,002$) e, na sua magnitude, comparando os grupos dois a dois. Assim, verificou-se que, a diferença entre o grupo de linfoma e o grupo de controlo é estatisticamente significativa, verificando-se o mesmo com a diferença entre o grupo de mastocitoma e o grupo de linfoma, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre o grupo do mastocitoma e o grupo controlo, como se pode observar na tabela 12.

Tabela 12: Comparação dos valores de PON1 entre os grupos estudados.

Grupos	Valor de p	Significância
Linfoma – Controlo	0,00001	S
Mastocitoma – Controlo	0,51580	NS
Mastocitoma - Linfoma	0,000223	S

Legenda: S = resultado estatisticamente significativo; NS = resultado estatisticamente não significativo.

3.3. Valores de PON1 nos doentes oncológicos em função de diversos fatores

Considerando o grupo dos doentes oncológicos, apresentam-se de seguida os resultados obtidos na análise da atividade da PON1 dos fatores já referidos: idade, género e estado geral, de forma a avaliar a influência dos mesmos neste estudo independentemente do tipo de neoplasia por eles apresentado.

3.3.1. Idade

A comparação dos valores da PON1 obtidos nos doentes oncológicos com menos de 10 anos (média de 0,958 U/ml) e com 10 anos ou mais (média de 1,036 U/ml) não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,758$), pelo que, podemos concluir que nesta amostra populacional a idade não influenciou a atividade da PON1. A distribuição dos valores de PON1 nestes dois grupos apresenta-se no gráfico 2.

3.3.2. Género

No grupo de doentes oncológicos foram incluídos 12 machos e 12 fêmeas, com uma média de valor de atividade da PON1 de 0,995 U/ml e 0,973 U/ml, respetivamente. Esta diferença entre os géneros não foi estatisticamente significativa ($p = 0,479$), pelo que podemos concluir que nesta amostra populacional o género não influenciou a atividade da PON1. A distribuição dos valores de PON1 das fêmeas e dos machos do grupo estudado pode ser observada no gráfico 3.

Gráfico 2: Valor da PON1 em animais com mais de 10 anos e em animais com 10 anos ou menos.

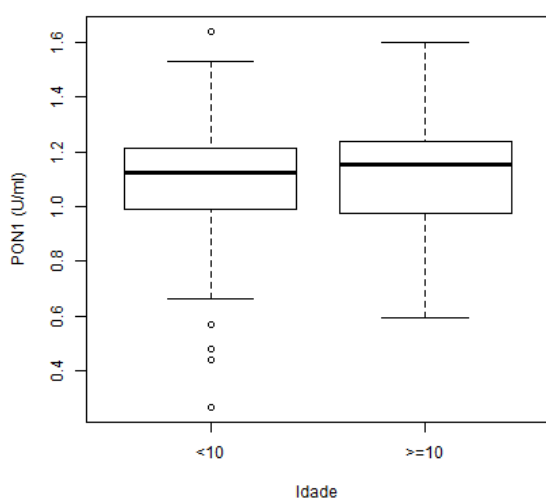
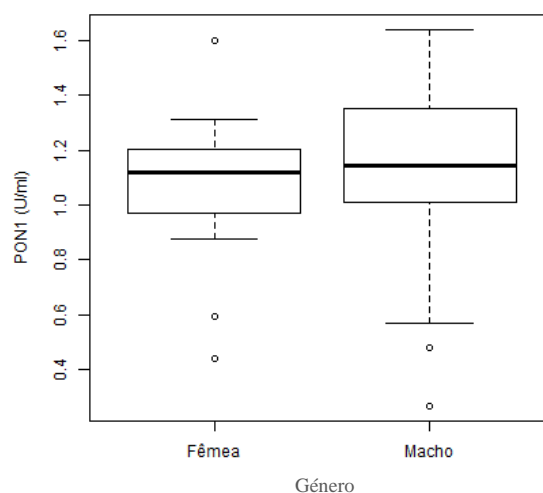


Gráfico 3: Valores da PON1 em fêmeas e em machos.



3.3.3. Alterações do estado geral dos doentes oncológicos

No grupo de doentes oncológicos observaram-se, em sete animais, perturbações do foro gastrointestinal como vômito (n=5 animais com linfoma e n=2 animais com mastocitoma) e diarreia (n=3 animais com linfoma), sendo que todos os animais com diarreia apresentavam também vômito.

As alterações à normalidade dos valores do hemograma (Anexo, tabela 16) foram observadas em 30% dos animais e consistiram em anemia normocítica normocrômica (n=3, um animal com linfoma e dois com mastocitoma), anemia hipocrômica e microcítica (n=1, um animal com linfoma), leucocitose (n=5, três animais com linfoma e dois com mastocitoma) e leucopenia (n=1, um animal com mastocitoma).

Tal como no hemograma, 30% dos animais do grupo estudado apresentaram alterações nas análises bioquímicas (Anexo, tabela 16), tendo sido possível observar alterações: na ureia e no cloro (n=1, animal com linfoma); simultaneamente na alanina aminotransferase (ALT) e na fosfatase alcalina sérica (FAS) (n=2, animais com linfoma); apenas nos níveis de ALT (n=1, animal com mastocitoma); nos níveis de glucose (n=1, animal com linfoma); e nos níveis de ureia e creatina (n=1, animal com linfoma).

Nas radiografias torácicas efetuadas (Anexo, tabela 17), 17% dos animais mostraram alterações como derrame pleural (n=1, animal com linfoma), padrão broncointersticial difuso não estruturado e linfadenopatia traqueobrônquica (n=1, animal com linfoma), e radiopacidade intersticial (n=1, animal com mastocitoma).

Apenas três animais realizaram radiografia abdominal (Anexo, tabela 17). Durante este exame um animal com linfoma apresentou alterações como hepatomegalia e perda de detalhe, outro apresentou evidências de presença de líquido e gás livre e num animal com mastocitoma observou-se hepatomegalia.

Dos 16 animais que fizeram ecografia abdominal (Anexo, tabela 17), metade dos animais apresentaram alterações no fígado e no baço (n=2, animais com linfoma) e um destes com aumento dos linfonodos; líquido livre no abdómen (n=1 animal com linfoma); alterações no baço (n=2, animais com mastocitoma); doença renal crónica e alterações no fígado (n=1, animal com mastocitoma); alterações nos linfonodos ilíacos, baço e rins (n=1, animal com mastocitoma); e um quisto no rim direito (n=1, animal com mastocitoma).

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas, com um nível de confiança de 95%, para os valores de atividade da PON1 quando se compararam os animais que apresentavam alterações do trato gastrointestinal com os que não as apresentavam ($p = 0,007$) e do hemograma ($p = 0,033$). Não foram, no entanto, encontradas diferenças significativas nos valores de

atividade da PON1 entre animais com e sem alterações observadas nos restantes exames complementares realizados. Na tabela 13 são apresentados os resultados da atividade da PON1 e do valor de p para análise das diferentes alterações do estado geral dos doentes oncológicos sem considerar o tipo de neoplasia apresentado.

Tabela 13: Análise estatística dos valores de atividade da PON1 apresentados pelos animais com e sem alterações no trato gastrointestinal, no hemograma, nas análises bioquímicas, nas radiografias torácicas e na ecografia abdominal.

Alterações	Valores da média de PON1 (U/ml)		Valor de p	Significância
	Não	Sim		
Trato Gastrointestinal	1,118	0,660	0,007	S
Hemograma	1,120	0,734	0,033	S
Bioquímicas	1,095	0,748	0,112	NS
Radiografia Torácica	1,097	0,617	0,076	NS
Ecografia Abdominal	1,120	0,908	0,442	NS

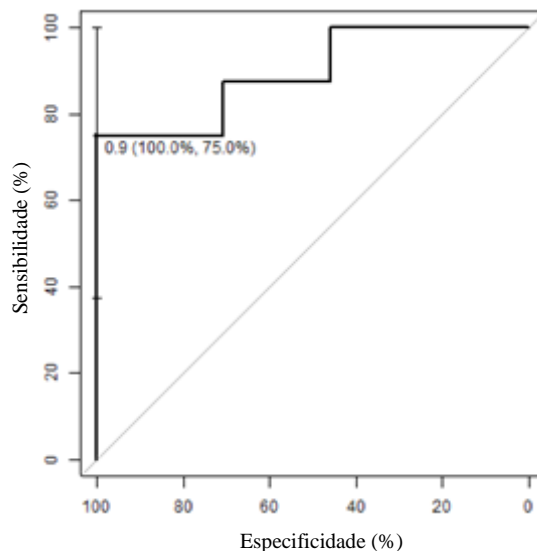
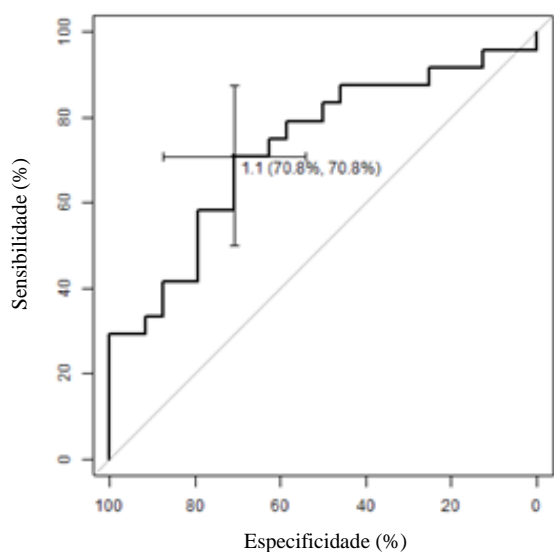
Legenda: S = resultado estatisticamente significativo; NS = resultado estatisticamente não significativo.

3.4. Identificação dos valores de “Cut-off” da atividade da PON1

O valor de “Cut-off” ótimo para diferenciar os animais do grupo controlo e os animais do grupo de doentes oncológicos quanto à atividade da PON1 foi de 1,1 U/ml, correspondente a uma especificidade de 70,8%, com um intervalo de confiança de 95% entre 54,2% e 87,5% e uma sensibilidade de 70,8%, com um intervalo de confiança de 95% entre 50% e 87,5%, como se pode observar no gráfico 4.

O valor de “Cut-off” ótimo para diferenciar os animais do grupo de doentes com linfoma e os animais do grupo controlo foi de 0,9 U/ml, correspondente a uma especificidade de 100%, com um intervalo de confiança de 95% entre 100% e 100% e uma sensibilidade de 75%, com um intervalo de confiança de 95% entre 37,5% e 100%, como se pode observar no gráfico 5.

Gráfico 4: Curva ROC entre o grupo de doentes oncológicos e o grupo de controlo. Gráfico 5: Curva ROC entre o grupo de doentes com linfoma e o grupo de controlo.

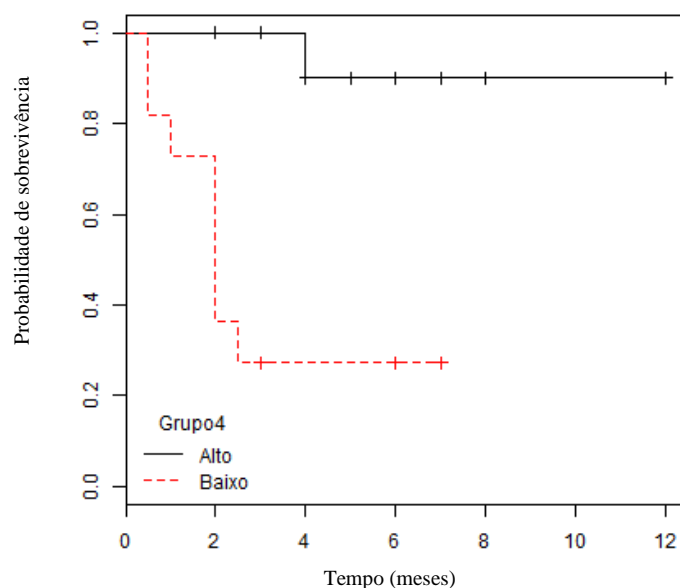


3.5. Avaliação do tempo de sobrevivência e do valor prognóstico de PON1

Tal como referido anteriormente, a partir dos valores obtidos através da curva de ROC, utilizou-se o estimador de Kaplan-Meier de forma a avaliar o tempo de sobrevivência dos animais do grupo de doentes oncológicos após a colheita da amostra de sangue utilizada para a determinação dos níveis de atividade da PON1. Assim, considerou-se que um nível “Alto” de atividade da PON1 corresponderia a valores superiores a 1 U/ml e que um nível “Baixo” de atividade da PON1 corresponderia a valores iguais ou inferiores a 1 U/ml. No grupo de doentes oncológicos estudados 13 animais apresentavam valores de PON1 “Alto”, enquanto os restantes 11 tinham valores de PON1 “Baixo”.

Como podemos observar no gráfico 6, a diferença entre o grupo de animais com PON1 “Alto” e com PON1 “Baixo” é bastante significativa. Os animais com valores de PON1 “Alto” apresentaram, 5 meses após a colheita de sangue, cerca de 90% de probabilidades de sobrevivência, enquanto os animais com valores de PON1 “Baixo” tiveram cerca de 30% de probabilidades de sobrevivência. Os valores obtidos para a função de sobrevivência entre os dois subgrupos são estatisticamente diferentes entre si ($p = 0,005$). Com estes resultados verifica-se que, os valores da PON1 podem ter um valor prognóstico importante nestas doenças já que, os animais com valores baixos de PON1 têm um tempo de sobrevivência menor, informação que terá todo o interesse tanto para o clínico como para o proprietário.

Gráfico 6 – Função de sobrevivência para o grupo de PON1 “Alto” e para o grupo de PON1 “Baixo”.



4. Discussão

A amostra incluída neste estudo foi composta por 24 canídeos que apresentaram diagnóstico definitivo de linfoma ou de mastocitoma através do exame de diagnóstico realizado por análise citológica ou histopatológica das amostras, colhidas por PAAF ou por biópsia, respetivamente. A colheita de sangue foi realizada após o diagnóstico definitivo do tipo de neoplasia e antes da implementação de qualquer tipo de tratamento.

Este estudo foi realizado apenas em cães devido à maior casuística de consultas oncológicas caninas relativamente às felinas no Hospital Escolar da FMV, onde decorreu o estágio curricular. Contudo, o curto período de tempo disponível para a realização do trabalho prático dificultou a recolha de casos. Se o número de animais, tanto do grupo de animais com linfoma como do grupo de animais com mastocitoma, tivesse sido superior, o poder da análise estatística e a representatividade da população utilizada seriam maiores.

Neste estudo, nos doentes oncológicos não houve diferença na proporção dos géneros, o que está de acordo com o descrito anteriormente para animais com mastocitoma, nos quais se afirma não existir relação entre o género e o desenvolvimento neoplásico, podendo assim afetar igualmente machos e fêmeas (North & Banks, 2009; García, 2012). No entanto, o mesmo não acontece nos animais com linfoma, uma vez que existem estudos que reportam a existência de alguma controvérsia quanto à prevalência do género nesta neoplasia (Vail & Young, 2007; Kimura *et al*, 2011).

A média de idades do grupo de doentes oncológicos foi de oito anos, dos quais 67% dos animais apresentavam idades compreendidas entre os 6 e os 12 anos, revelando assim uma população adulta a sénior. Estes resultados vão ao encontro com o anteriormente descrito, uma vez que o linfoma ocorre maioritariamente em cães com idades compreendidas entre os 6 e os 7 anos (Vail & Young, 2007) e o desenvolvimento de mastocitoma tem maior incidência em cães de 8 anos (Thamm & Vail, 2007; Blackwood, 2011).

Vários estudos reportam a existência de um aumento dos marcadores de stress oxidativo com a idade, uma vez que, com o decorrer do tempo, o envelhecimento prejudica as funções corporais, existindo acumulação de lesão molecular no ADN, nas proteínas e nos lípidos, ocorrendo ainda um aumento do stress oxidativo intracelular devido à diminuição da progressão dos antioxidantes (Reuter *et al*, 2010). Tal facto pode induzir instabilidade dos cromossomas, mutação genética e/ou modulação do crescimento celular, resultando no desenvolvimento de neoplasias (Klaunig *et al*, 2010). Contudo, no estudo agora apresentado observou-se que, animais com 10 ou mais anos não apresentaram valores de atividade da PON1 estatisticamente diferentes em comparação com os valores obtidos nos animais com menos de 10 anos, o que pode ter sucedido devido ao pequeno número de indivíduos da amostra, podendo esta não ser representativa. No estudo de Rossi *et al* (2013) observou-se que cães com idades compreendidas entre os 4 e os 6 anos apresentaram níveis superiores de atividade da PON1 comparativamente com os animais de idade inferior a 3 anos, no entanto, não houve oportunidade para a realização desta análise no presente estudo devido ao diminuído número da amostra populacional o que condicionaria o poder da análise estatística.

Quando comparadas as médias dos valores de atividade da PON1 observadas nos animais do grupo controlo com as médias observadas nos doentes oncológicos observou-se uma diminuição do valor de atividade da PON1 na presença de neoplasias. Esta diminuição pode estar relacionada com o facto da PON1 ter propriedades antioxidantes, uma vez que, existem evidências da participação de RLO no desenvolvimento tumoral, podendo-se assim observar uma diminuição na concentração de antioxidantes na circulação sanguínea (Stavinohová *et al*, 2012). Está descrito o envolvimento dos RLO na ativação de algumas vias de sinalização, o que contribui para o desenvolvimento tumoral através da regulação da proliferação celular, angiogénese e metástases (Reuter *et al*, 2010). Estudos em medicina humana reportam diminuição do valor de atividade da PON1 em pacientes com cancro colo-rectal (Bulboller *et al*, 2013), cancro do pâncreas (Vecka *et al*, 2012), cancro dos pulmões (Ahn *et al*, 2014), cancro da mama (Bobin-Dubigeon *et al*, 2012) e com cancro do estômago (Atay *et al*, 2014). Nas duas últimas formas de cancro os valores da atividade da PON1 revelaram-se um fator de prognóstico do tempo de sobrevivência dos pacientes.

Neste estudo, foram incluídos animais com diferentes tipos de linfoma, nomeadamente, linfomas multicêntricos, esplénicos e hepatoesplénicos, linfomas de elevado, moderado e baixo índice mitótico e linfomas centroblasticos e imunoblasticos. Esta variação na classificação e no tipo de linfoma dos animais estudados, pode justificar a diferença entre os valores mínimos e máximos da atividade da PON1 observados no presente estudo.

Comparativamente com o que foi observado para o linfoma, no presente estudo, foi também observada uma grande variabilidade dos valores da atividade da PON1 nos animais com mastocitoma, o que se pode justificar com a presença e o estudo de animais com mastocitoma tanto de baixo como de alto grau de malignidade.

No presente estudo, os animais com linfoma apresentaram resultados de atividade da PON1 significativamente diferentes dos apresentados pelos animais com mastocitoma e pelos animais controlo, enquanto os animais com mastocitoma apresentaram valores idênticos aos dos animais controlo. Tal pode dever-se ao facto de o linfoma ser uma neoplasia linfoproliferativa do tecido hematopoiético, causado pela expansão de células linfóides malignas e com origem nos órgãos sólidos, como os linfonodos, o baço, o fígado e a medula óssea (Vail & Young, 2007; Couto, 2010), podendo também ter origem em órgãos não linfóides (Vail, 2011). Assim, e embora existam diferentes fatores que influenciam o prognóstico, a sobrevida média de um animal com linfoma tratado com corticosteróides é de 3 meses, podendo atingir os 6 a 9 meses quando implementada uma terapêutica quimioterápica (Albertus, 2012). O mastocitoma ocorre mais frequentemente na derme e no tecido subcutâneo havendo apenas cerca de 11 a 14% dos casos com envolvimento multicêntrico (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009; Blackwood, 2011; García, 2012), enquanto no linfoma apenas 6% tem representação cutânea, sendo a forma visceral mais frequente (Vail, 2011). Por outro lado, os nódulos de mastocitoma podem manter-se estáveis durante anos antes de se desenvolverem de forma rápida, pois os tumores de baixo grau de malignidade tendem a ser estáveis e de progressão lenta (North & Banks, 2009; García, 2012).

Durante as consultas de oncologia e após a anamnese, verificou-se que cerca de 30% dos doentes oncológicos apresentavam sinais de distúrbios gastrointestinais como vômito e diarreia. Embora os sinais clínicos apresentados pelos animais com linfoma variem de acordo com a localização anatómica (Couto, 2010), com a extensão do tumor (Vail & Young, 2007) e a linfadenopatia periférica ser o sinal clássico, estes doentes podem apresentar outros sinais não específicos como anorexia, vômito e diarreia (North & Banks, 2009), principalmente quando se apresentam com linfomas multicêntricos, linfomas digestivos e, por vezes, linfomas intravasculares (Vail & Young, 2007; Couto, 2010). No mastocitoma os sinais sistémicos são raros porém, podem verificar-se distúrbios gastrointestinais resultantes da desgranulação dos

tecidos da neoplasia, do desenvolvimento de úlceras gástricas no seguimento de sinais paraneoplásicos ou resultarem do desenvolvimento de um mastocitoma intestinal primário (North & Banks, 2009).

As alterações no hemograma foram observadas com maior prevalência no linfoma do que no mastocitoma, em 38% e 25% dos animais, respetivamente. No linfoma as alterações hematopoiéticas resultam da infiltração da medula óssea por células neoplásicas, hipofunção ou hiperfunção esplénica, doença crónica ou alterações paraneoplásicas imunomediadas (Couto, 2010). A anemia presente nos animais com linfoma é, geralmente, não regenerativa, ou seja, normocítica e normocrómica (Vail & Young, 2007; Couto, 2010). Contudo, nos animais estudados apenas um apresentou esta alteração. No outro animal com linfoma que apresentou alterações na hemoglobina e na contagem de eritrócitos, observou-se a presença de uma anemia hipocrómica e microcítica, o que sugere perda crónica de sangue.

No hemograma dos animais estudados com linfoma observaram-se ainda alterações na contagem dos leucócitos e monócitos. Estas alterações podem ter resultado da produção local ou sistémica de substâncias bioativas pelas células tumorais (Couto, 2010).

Na literatura está descrito que o hemograma dos animais com mastocitoma tem pouco significado clínico, uma vez que na maior parte dos casos não se encontram quaisquer alterações, pois os doentes na sua maioria não têm sinais sistémicos (North & Banks, 2009; Blackwood, 2011). Contudo, neste estudo, os animais com mastocitoma apresentaram alterações como linfopenia, leucocitose, neutrofilia e anemia normocítica e normocrómica. Na maior parte destes animais, observaram-se alterações imagiológicas a nível dos linfonodos, baço, fígado e rins, concomitante ou isoladamente, podendo estas estar relacionadas entre si e não com a existência da neoplasia.

A comparação dos valores da atividade da PON1 nos doentes oncológicos com e sem alteração no hemograma revelou-se significativamente diferente, estando de acordo com o esperado, uma vez que, as alterações no hemograma destes animais podem ter ocorrido devido às alterações provocadas pelo desenvolvimento tumoral, ou seja, os animais em que se observaram estas alterações apresentavam sinais paraneoplásicos, indicando um estadio mais avançado da neoplasia comparativamente com os que não apresentavam quaisquer sinais.

As alterações nos parâmetros bioquímicos analisados foram observadas maioritariamente nos animais com linfoma, o que pode ocorrer devido à produção de substâncias bioativas pelas células tumorais ou devido à falência de órgãos, secundária à infiltração neoplásica (Couto, 2010). Apenas um animal com mastocitoma apresentou alterações nos parâmetros bioquímicos, o que está de acordo com o descrito, uma vez que a maior parte dos animais que se apresentam à consulta não têm sinais sistémicos e não apresentam, por norma, qualquer alteração nos

valores sanguíneos dos parâmetros bioquímicos. No animal que apresentou estas alterações foram observadas, na ecografia abdominal, alterações no baço, o que pode justificar as alterações bioquímicas com a presença de uma doença concomitante. Na comparação estatística destes parâmetros não foram encontradas diferenças significativas, o que não vai ao encontro do esperado, provavelmente devido ao diminuído número de indivíduos da amostra populacional.

A radiografia torácica e abdominal e a ecografia abdominal tiveram como finalidade identificar as neoplasias e efetuar o seu estadiamento. Particularmente no linfoma, o qual: quando multicêntrico pode ter envolvimento dos linfonodos, do fígado, do baço e da medula óssea; quando mediastínico tem origem no mediastino; quando digestivo é caracterizado por infiltração do trato gastrointestinal e dos linfonodos intra-abdominais; e quando extranodal pode afetar qualquer tecido ou órgão como os rins, os olhos, a pele, os pulmões e o sistema nervoso central (Vail & Young, 2007; Couto, 2010; Vail, 2011). Embora o mastocitoma se apresente maioritariamente na derme e no tecido subcutâneo, este pode ter envolvimento multicêntrico em cerca de 11 a 14% dos casos (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009; Blackwood, 2011), podendo metastizar nos linfonodos regionais, no fígado, no baço, na medula óssea, no sangue e nos pulmões (García, 2012). Existe também a possibilidade da ocorrência de mastocitose, o que pode induzir o desenvolvimento de linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia, assim como, de derrames pleurais e peritoneais que podem conter mastócitos neoplásicos, resultando de uma mastocitose disseminada (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009). Todos estes fatores podem justificar as alterações encontradas nos exames complementares imagiológicos, contudo as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas, o que mais uma vez se pode dever ao facto de a amostra populacional ter um número reduzido de indivíduos.

O prognóstico do linfoma canino varia em função de diferentes fatores como a localização e a extensão da doença, a presença ou não de sinais clínicos, o estadiu histopatológico e o imunofenótipo, a exposição anterior a fármacos anti-neoplásicos ou a corticoesteróides e o consequente desenvolvimento de multirresistências aos fármacos, a alteração no processo de morte celular e da proliferação tumoral e, a presença de síndromes paraneoplásicas ou de doenças concomitantes (Vail & Young, 2007). Relativamente ao grau histopatológico é difícil a sua determinação prognóstica, sabendo-se apenas que, cães com linfoma de grau intermédio e alto (células grandes, centrobásticas e imunobásticas) tendem a responder à quimioterapia, mas podem ter recorrência precoce, enquanto cães com linfoma de baixo grau (linfócitos pequenos e centrocíticos) têm uma baixa taxa de resposta à quimioterapia, contudo têm maior sobrevida que os animais com linfoma de grau intermédio e alto (Vail & Young, 2007). A

localização é também importante, uma vez que os linfomas cutâneos difusos primários, gastrointestinais difusos, hepatoesplênicos e primários do SNC estão associados a mau prognóstico, assim como o envolvimento da medula óssea e a circulação de linfócitos malignos na corrente sanguínea (Vail & Young, 2007). Atualmente existem vários marcadores de prognóstico em estudo como a concentração de alfa 1-glicoproteína ácida, a sobreexpressão das metaloproteínas 2 e 9, a alteração dos níveis séricos do VEGF, a perda da expressão do antígeno B5 e a presença de glicoproteínas P nas células tumorais (Albertus, 2012).

O prognóstico dos mastocitomas depende também de uma série de fatores (Blackwood, 2011; García, 2012). O grau histológico é o fator mais importante de prognóstico, sendo os tumores mais anaplásicos (grau III) os que apresentam maior potencial metastático, enquanto os tumores de baixo grau de malignidade tendem a ser estáveis durante várias semanas, meses ou mesmo anos e de progressão lenta (North & Banks, 2009; García, 2012). Os mastocitomas localizados na região do pavilhão auricular, oral, subungueal, perianal, inguinal, escrotal e prepucial têm frequentemente um comportamento mais agressivo do que seria de esperar das neoplasias do mesmo grau histológico, fazendo assim com que o tempo de remissão seja mais curto e que os animais tenham menor sobrevida (Thamm & Vail, 2007; García, 2012). Nos estádios mais avançados da doença e nos animais que apresentam sinais clínicos existe um pior prognóstico. No prognóstico do mastocitoma é importante a taxa de proliferação celular, que se avalia através do índice mitótico, da frequência relativa de AgNORs, da expressão de PCNAs ou da concentração de Ki-67 imunopositivo, pois quanto maiores são os valores obtidos nestes parâmetros pior é o prognóstico (Thamm & Vail, 2007; North & Banks, 2009). A BrdU é outro marcador de proliferação celular (North & Banks, 2009). Outro fator de prognóstico bastante importante é a mutação do c-kit, uma vez que animais que apresentam esta mutação têm menor sobrevida (Marconato *et al*, 2014).

No presente estudo pode observar-se que, comparando os valores da atividade da PON1 dos animais controlo e dos animais doentes oncológicos, para um valor limiar de PON1 de 1,1 U/ml, existe uma especificidade e uma sensibilidade de 71%, ou seja, existe 29% de probabilidade, utilizando este limiar, do teste dar falsos positivos ou falsos negativos. No entanto, se a comparação efetuada incluir apenas o grupo de doentes com linfoma e o grupo controlo, observa-se que, para um valor limiar de atividade de PON1 de 0,9 U/ml, existe uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 75 %, ou seja, neste teste é possível que 25% dos animais sejam falsos negativos. O objetivo da curva de ROC realizada neste estudo não foi estabelecer um valor de atividade da PON1 como ferramenta de diagnóstico mas sim, encontrar um valor de “Cut off” para a realização da análise de sobrevivência. Uma vez que, de acordo

com o estado geral do doente, existem exames complementares como as PAAFs e as biópsias, com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico destas neoplasias.

Na avaliação do valor prognóstico da atividade da PON1, constatamos que, dos animais com valores de PON1 “Altos” (com valores de PON1 superiores a 1 U/ml) apenas um animal morreu quatro meses após a colheita, enquanto alguns animais com PON1 “Baixos” não resistiram ao primeiro mês após a colheita. Pode ainda constatar-se que, quando os valores de atividade da PON1 são “Altos” passados 5 meses da colheita, há 90% de probabilidades de sobrevivência, enquanto se os valores da PON1 forem “Baixos” há apenas 30% de probabilidade de os animais sobreviverem após 5 meses. Os resultados do estimador Kaplan-Meier foram significativamente diferentes, podendo-se concluir que a análise do valor de atividade da PON1 tem um elevado valor prognóstico nos doentes oncológicos caninos, mais especificamente nos animais com linfoma.

O prognóstico médico é o conhecimento ou o juízo antecipado da evolução das doenças baseado no diagnóstico clínico. Assim, um bom fator de prognóstico tem de preencher alguns requisitos como a rapidez da sua realização, alta especificidade e sensibilidade e, preferencialmente, ser monetariamente acessível aos proprietários. Embora já existam bastantes fatores de prognóstico para o linfoma e para o mastocitoma, a análise da atividade da PON1 pode ser vantajosa, uma vez que não requer exames complementares adicionais. A recolha de sangue a que os animais são submetidos é sempre realizada por rotina num doente oncológico para avaliar o seu estado geral e para avaliar a eventual depressão da medula óssea antes e no decorrer do tratamento, não existindo dor adicional provocada ao animal para a realização desta colheita, para além de que é necessário apenas um pequeno volume de sangue (0,5 a 1 ml). A metodologia analítica é fácil, de realização rápida e envolve poucos custos adicionais para o proprietário. Assim sendo, após o diagnóstico de neoplasia, mais especificamente de linfoma, a medição dos valores de atividade de PON1 pode fornecer informação prognóstica valiosa tanto para o clínico na decisão da abordagem terapêutica a aplicar como para o proprietário na tomada de decisões relativamente ao seu animal

5. Conclusão

O presente trabalho permitiu concluir que a avaliação da atividade da PON1 pode ter um importante valor prognóstico nos doentes oncológicos caninos, nomeadamente nos animais diagnosticados com linfoma.

Embora o poder da análise estatística pudesse estar comprometido devido ao número de animais estudados, o presente estudo permitiu-nos chegar a conclusões bastante interessantes a nível clínico.

Os resultados demonstraram a existência de uma diminuição dos níveis de atividade da PON1 na presença de neoplasias, mais especificamente na presença de linfoma. Esta ocorrência é explicada pelo aumento do stress oxidativo com a diminuição da atividade antioxidante que é própria da PON1. Os grupos de doentes com diferentes géneros e idades não revelaram níveis de PON1 significativamente diferentes, o que permitiu analisar a PON1 dos doentes oncológicos de forma mais fidedigna e sem a interferência destes fatores nos resultados.

Nos grupos estudados (animais controlo, com linfoma e com mastocitoma), observou-se que os animais com linfoma apresentaram valores de PON1 bastante inferiores aos restantes, podendo tal ocorrer devido ao facto do linfoma ser uma neoplasia do tecido hematopoiético, afetando órgãos vitais, enquanto os nódulos de mastocitoma aparecem mais frequentemente na derme e no tecido subcutâneo, podendo permanecer estáveis durante anos.

Os parâmetros do estado geral dos doentes oncológicos foram avaliados, contudo nem todos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre neoplasias e estádios da doença. Este resultado não está de acordo com o esperado, uma vez que, quanto mais avançado o estadio da doença, mais alterações nos parâmetros gerais os animais apresentam, e assim, seria esperada uma diminuição mais acentuada nos valores de PON1.

Neste estudo detetou-se ainda um valor limiar ótimo para analisar a função de sobrevivência dos doentes oncológicos, o que permitiu observar que animais com valores de atividade da PON1 “Altos” tiveram um maior tempo de sobrevivência do que os com valores de atividade da PON1 “Baixos”. Esta observação sugere que a análise do valor de atividade de PON1 tem um elevado valor de prognóstico nos doentes oncológicos caninos, mais especificamente, nos animais com linfoma.

Embora já existam vários marcadores de prognóstico para estas neoplasias, a análise da atividade da PON1 revelou ser vantajosa uma vez que, não requer exames complementares adicionais, é de fácil e rápida execução e, envolve custos adicionais diminutos para o proprietário.

Conclui-se assim que, a PON1 poderá ser um marcador de prognóstico útil ao médico veterinário no manejo clínico da doença e para o processo de tomada de decisão dos proprietários relativamente à abordagem a adotar para o seu animal.

A realização de estudos similares para diferentes e diversas neoplasias torna-se pertinente, uma vez que todas elas têm manifestações sintomatológicas e quadros clínicos diferentes nos doentes que as apresentam. Para além disso, seria interessante estudar a atividade da PON1 nos diferentes estadios e graus de malignidade de cada neoplasia, pois o estado geral do doente varia e é de esperar que se obtenham resultados diferentes na atividade desta enzima em cada estadio e/ou grau da doença. A utilização deste parâmetro na avaliação do sucesso das terapêuticas instituídas, assim como da evolução do estado geral do doente seria também desafiante.

Os resultados deste trabalho sugerem também que, o estudo da atividade da PON1 utilizando outros métodos de avaliação da mesma, nomeadamente, a lactonase sérica e a arilesterase, será pertinente e terá cabimento no âmbito da investigação clínica.

Capítulo IV - Bibliografia

- Ackerman L.V. & Regato J.A. (2007). The warning signs of Cancer in Geriatric pets. In Villalobos A. & Kaplan L., *Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond*. (pp. 51-57, 76-78). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Adly A.A.M. (2010). Oxidative Stress and Disease: An Updated Review. *Research Journal of Immunology*, 3 (2) (pp. 129-145).
- Ahn J.M., Sung H.J., Yoon Y.H., Kim B.G., Yang W.S., Lee C, Park H.M., Kim B.J., Lee S.Y., An H.J. & Cho J.Y (2014). Integrated glycoproteomics demonstrates fucosylated serum paraoxonase 1 alterations in small cell lung cancer. *Molecular & cellular proteomics*, 13 (1) (pp. 30-48).
- Albertus J.C. (2012). Linfoma. In Oncología Veterinaria. *Manuales clínicos por especialidades: (2ª edição)*. Zaragoza, Spain: Servet editorial - Grupo Asís Biomedica S. L. (pp. 81 - 101).
- Alexandrakis I., Tuli R., Ractliffe S.C., Tappin S.W., Foale R. D., Roos A. & Slater K. J. (2014). Utility of a multiple serum biomarker status and relapse in dogs with lymphoma undergoing treatment with chemotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, Acedido a 5 de Fevereiro de 2015, em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vco.12123/pdf>.
- Atay A.E., Kaplan M.A., Evliyaoglu O., Ekin N. & Isikdogan A. (2014). The predictive role of paraoxonase 1 (PON1) activity on survival in patients with metastatic and nonmetastatic gastric cancer. *Clinical Therapeutics*, 165(1) (pp. 1-5).
- Axiak S.M., Carreras J.K., Hahn K.A, Endicott M.M., Parshley D.E. & King G.K. (2006). Hematologic changes associated with half-Body irradiation in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (pp. 1398-1410).
- Aydin I., Bulbul A., Avci G.E & Celik H.A. (2009). Serum oxidative status and adenosine deaminase activity in dogs with transmissible venereal tumor. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53 (pp. 771-774).
- Bahar F.G., Ohura K., Ogihara T. & Imai T. (2012). Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, October, 101 (10) (pp. 3979-3988).
- Balducci L. (2007). Molecular Biology of Cancer and Aging. In Villalobos A. & Kaplan L., *Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond*. (pp. 3-21). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Biller B.J. & Dow S. (2007). Capítulo 13: Imunoterapy for cancer. In Withrow S.F. & Vail D.M., *Small Animal Clinical Oncology (4ª edição)*. (pp. 217-218). Missouri, USA: Saunders Elverier Editora.
- Blackwood L. (2011). Tumours of skin and subcutaneous tissues. In Dobson J.M. & Lascelles B.D., *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology (3ª edição)* (pp. 142-150).

- Bobin Dubigeon C., Jaffré I., Joalland M., Classe J., Campone M., Hervé M. & Bard J.M. (2012). Paraoxonase 1 (PON1) as a marker of short term death in breast cancer recurrence. *Clinical Biochemistry*, 45 (16-17). (pp. 503-505).
- Bulbulla N., Eren E., Ellidag H.Y., Oner O.Z., Sezer C., Aydin O. & Yilmaz N. (2013). Diagnostic value of thiols, paraoxonase 1, arylesterase and oxidative balance in colorectal cancer in human. *Neoplasma*, 60 (4). (pp. 419-424).
- Ceron J.J., Tecles F. & Tvarijonaviciute A. (2014). Serum paraoxanase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Veterinary Research*. Acedido a 10 de Fevereiro de 2015 em <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/74>.
- Couto C.G. (2010). Parte Onze Oncologia. In Nelson RN & Couto CG. *Medicina Interna de Pequenos Animais de Companhia*. (4ª edição). (pp. 1145-1211). Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Editora Ltda.
- Emerson R.W. (2007). Basic Types of cancer and Their Biological Behavior. In Villalobos A. & Kaplan L., *Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond*. (pp. 91-94). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Freeman L.M. (2009). Antioxidants in Cancer Treatment: Helpful or Harmful?. *Compendium: Continuing Education for Practising Veterinarians*, 31 (4) (pp. 154-158).
- Frimberger AE., Moore AS., Rassnick K.M., Cotter SM., O'Sullivan J.L.&, Quesenberry PJ (2006). A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (2). (pp. 355-364).
- Fujiwara N., Kawasaki H., Yabe R., Christensen D.J., Vitek M.P., Mizuno T., Sato K. & Ohama T. (2013). A potential therapeutic application of SET/I2PP2A inhibitor OP449 for canine T-cell lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75 (3). (pp. 349-354).
- García S.M. (2012). Mastocitoma. In Oncología Veterinaria. *Manuales clínicos por especialidades* (2ª edição). Zaragoza, Spain: Servet editorial - Grupo Asís Biomedica S. L. (pp. 103-116).
- Harel M., Aharoni A., Gaidukov L., Brumshtein B., Khersonsky O., Meged R., Dvir H., Ravelli R.B.G., McCarthy A., Toker L., Silman I., Sussman J.L. & Tawfik D.S. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11 (5) (pp. 412-419).
- Helfand S.C. (2011). Therapies of the future. In Dobson JM & Lascelles BD. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3ª edição) (pp. 92-94).
- Hwang C.C., Umeki S., Kubo M., Hayashi T., Shimoda H., Mochizuki M., Maeda K., Baba K., Hirapka H., Coffey M., Okuda M. & Mizuno T (2013). Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor. *PLOS ONE* 8 (9). Acedido a 17 de Outubro de 2014, em www.plosone.org.

- Ibba F., Rossi G., Meazzi S., Giordano A. & Paltrinieri S. (2015). Serum concentration of high density lipoproteins (HDLs) in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Science*, 98 (pp. 89-91).
- Karayannopoulou M., Fytianou A., Assaloumidis N., Psalla D., Savvas I. & Kaldrymidou E. (2013). Lipid peroxidation in neoplastic tissue of dogs with mammary cancer fed with different kinds of diet. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37 (pp. 449-453).
- Khateeb J., Gantman A., Kreitenberg A.J., Aviram M. & Fuhrman B. (2010). Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: A role for PPAR-gamma pathway. *Atherosclerosis*, 208 (1) (pp. 119-125).
- Kimura K.C., Zanini D.A., Nishiya A.T., Dias R.A. & Dagli M.L. (2011). Morphology and immunophenotypes of canine lymphomas: a survey from the service of animal science, University of São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 4 (3) (pp. 199-206).
- Kiupel M., Teske E. & Bostock D. (1999). Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology*, 36 (4) (pp. 292-300).
- Klaunig J.E., Kamendulis L.M. & Hocevar B.A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38 (1) (pp. 96-109).
- Kocaturk M., Tvarijonaviciute A., Martinez-Subiela S., Tecles F., Eralp O., Yilmaz Z. & Ceron J.J. (2014). Inflammatory and oxidative biomarkers of disease severity in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 56 (2) (pp. 119-124).
- Kohen R. & Nyska (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30 (6) (pp. 620-650).
- Lawman M., Eidizadeh S., Selmon C., Kane C., Xigacos L., Kaufman L., Shaw N. & Lawman P. (2008). Anti-tumor response induced by autologous cancer vaccine in canine lymphoma. *Cancer therapy*, 6 (pp. 824-840).
- Litvinov D., Mahini H. & Garelnabi M. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *North American Journal of Medical Sciences*, 4 (11) (pp. 523-532).
- Macotpet A., Suksawat F., Sukon P., Pimpakdee K., Pattarapanwichien E., Tangrassameeprasert R. & Boonsiri P (2013). Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. *BMC Veterinary Research*, 9:101. Acedido a 14 de Outubro de 2014, em <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/101>.
- Marconato L., Zorzan E., Giantin M., Di Palma S., Cancedda S. & Dacasto M. (2014). Concordance of c-kit mutational status in matched primary and metastatic cutaneous canine mast cell tumors at baseline. *Journal of Veterinary Medicine*, 28 (2) (pp. 547-553).
- Martinez-Subiela S., Cerón J.J., Strauss-Ayali D., Garcia-Matinez J.D., Tecles F., Tvarijonaviciute A., Caldin M. & Baneth G. (2014). Serum ferritin and paraoxonase-1

- in canine leishmaniosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37 (1) (pp. 23-29).
- Matés J.M. & Sánchez-Jiménez F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience*, 4 (pp. 339-345).
- Mauldin G.E. (2007). Capítulo 16 Seção B, Nutricional management of the cancer patient. In Withrow SF & Vail DM. *Small Animal Clinical Oncology* (4ª edição). (pp. 309, 316-17). Missouri, USA: Saunders Elvier Editor.
- Méndez J.C., Carreton E., Martínez S., Tvarijonaviciute A., Cerón J.J. & Montoya-Alonso J. A. (2014). Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 204 (3-4) (pp. 420-425).
- Meyers F. (2007) Decision making with Advanced and recurrent cancer in the geriatric patient. In Villalobos A. & Kaplan L., *Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond*. (pp. 257-258, 263-234). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- NCBI. PON1 paraoxonase 1 [Canis lupus familiaris (dog)] Gene ID: 475234, atualizado a 19 de Janeiro de 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/475234>.
- North S. & Banks T. (2009). *Introduction to Small Animal Oncology*. (pp. 132, 154, 176-7, 183-93, 219-200, 225-31, 237-40, 243, 246-7, 254-255, 282). London, England: Saunders Elsevier
- Osborne C.A. (2007). Generating the Diagnosis and Prognosis of cancer in Geriatric Pets. In Villalobos A. & Kaplan L., *Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond*. (pp. 128-129). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Osborne C.A. (2007). Treating Cancer in Geriatric pets. In Villalobos A. & Kaplan L., *Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond*. (pp. 147-149, 153, 154). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Patruno R., Marech I., Zizzo N., Ammendola M., Nardulli P., Gadaleta C., Introna M., Capriuolo G., Rubini R.A., Ribatti D., Gadleta C.D. & Ranieri G. (2014). C-Kit expression, angiogenesis and grading in canine mast cell tumour: A unique model to study c-kit driven human malignancies. *BioMed Research International*, 2014. Acedido a 10 de Outubro de 2014, em <http://dx.doi.org/10.1155/2014/730246>
- Plavec T., Nemec S.A., Butinar J., Natasa T., Prezelj M., Kandel B. & Kessler M. (2008). Antioxidant status in canine cancer patients. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 58 (2-3) (pp. 275-286).
- Prasad M., Krueger M. & Krueger M. (2014). Decreased level of serum paraoxanase (PON) activity in dogs with dilated cardiomyopathy (DCM). *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 6 (9) (pp. 245-250).
- Pruitt A.F. & Thrall D.E. (2011). Principles of radiation therapy. In Dobson J.M. & Lascelles B.D., *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3ª edição) (pp. 84-85).

- Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M. & Aggarwal B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked?. *Free Radical Biology & Medicine*, 49 (11) (pp. 1603-1616).
- Rossi G., Giordano A., Pezzia F., Kjølgaard-Hansen M. & Paltrinieri S. (2013). Serum paraoxonase 1 activity in dogs: preanalytical and analytical factors and correlation with C-reactive protein and alpha-2-globulin. *Veterinary Clinical Pathology*, 42 (3) (pp. 329-341).
- Rossi G., Ibba F., Meazzi S., Giordano A. & Paltrinieri A. (2014). Paraoxonase activity as a tool for clinical monitoring of dogs treated for canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, 199 (1) (pp. 143-149).
- Rossi G., Kuleš J., Barić Rfaj R., Mrljak V., Lauzi S., Giordano A. & Paltrinieri S. (2014 b). Relationship between paraoxonase 1 activity and high density lipoprotein concentration during naturally occurring babesiosis in dogs. *Research in Veterinary Science*, 97 (2) (pp. 318-324).
- Scase T.J. & Dobson J.M. (2011). How to make a diagnosis. In Dobson JM & Lascelles BD. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3^a edição) (pp. 16 -17).
- Stavinohová R., Lorenzová J., Papežíková I., Borkovcová I., Pfeifr J., Lojek A., Mrázová M. & Crha M. (2012). Markers of oxidative and antioxidative activity in female dogs with mammary gland tumour with and without additional vitamin E supplementation. *Acta Veterinaria Republica Checa*, 81 (pp. 275-280).
- Suzano S.M.C., Sequeira J.L., Pessoa A.W.P., Porto C.D. & Oliveira D.E. (2008). Proliferação celular dos linfomas caninos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 45 (4) (pp. 313-319).
- Takeuchi Y., Fujino Y., Watanabe M., Takahashi M., Nakagawa T., Takeuchi A., Bonkobara M., Kobayashi T., Ohno K., Uchida K., Asano K., Nishimura R., Nakayama H, Sugano S., Ohashi Y. & Tsujimoto H. (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. *The Veterinary Journal*, 196 (3) (pp. 492-498).
- Thamm D.H. & Vail D.M. (2007). Capítulo 19. Mast Cell Tumours. In Withrow S.F. & Vail D.M., *Small Animal Clinical Oncology* (4^a edição). (pp. 402-416). Missouri, USA: Saunders Elvier Editor.
- Thamm D.H. (2011). A Practitioner's Guide to Canine Lymphoma. Acedido a 29 de Janeiro de 2014, em: <http://www.thewebinarvet.com/2011/08/a-practitioners-guide-to-canine-lymphoma-notes-from-webinar-2/>.
- Thrall M.A. (2007). Diagnostic Cytology in Clinical Oncology. In Withrow S.F. & Vail D.M., *Small Animal Clinical Oncology* (4^a edição). (pp. 118-20, 122, 125). Missouri, USA: Saunders Elvier Editor.
- Tvarijonaviciute A., Tecles F., Caldin M., Tasca S. & Cerón J. (2012). Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 73 (1) (pp. 34-41).

- TvariJonaviciute A., Caldin M., Martínez-Subiela S., Tecles F., Pastor J. & Ceron J.J. (2014). Serum paraoxanase 1 and butyrylcholinesterase in dogs with hyperadrenocorticism. *The Veterinary Journal*, 203 (2) (pp. 262-263).
- TvariJonaviciute A., García-Martínez J.D., Caldin M., Martínez-Subiela S., Tecles F., Pastor J. & Ceron J.J. (2015). Serum paraoxanase 1 (PON1) activity in acute pancreatitis of dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 56 (1) (pp. 67–71).
- Uttara B., Singh A.V., Zamboni P. & Mahajan R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative disease: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7 (1) (pp. 65-74).
- Vail D.M. (2011). Tumours of the Haemopoietic System. In Dobson JM & Lascelles BD. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3ª edição) (pp. 285-291).
- Vail D.M. & Young K.M. (2007). Capítulo 31 Seção A, Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In Withrow S.F. & Vail D.M., *Small Animal Clinical Oncology* (4ª edição). (pp. 699-722). Missouri, USA: Saunders Elverier Editora.
- Vajdovich P., Kriska T., Mézes M., Szabó P.R., Balogh N., Bánfi A., Arany-Tóth A., Gaál T. & Jakus J. (2005). Redox status of dogs with non-hodgkin lymphomas. An ESR study. *Cancer Letters*, 224 (pp. 339-346).
- Vecka M., Jáchymová M., Vávrová L., Kodydková J., Macášek J., Krechler T., Slabý A., Dušková J., Muravská A. & Zák A. (2012). Paraoxonase-1 (PON1) status in pancreatic cancer: relation to clinical parameters. *Folia Biologica*, 58 (6) (pp. 231-237).
- Weishaar K.M., Thamm D.H., Worley D.R. & Kamstock D.A. (2014). Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and proposed classification system for the evaluation of node metastasis. *Journal of Comparative Pathology*, 151 (4) (pp. 329-338).
- Winter J.L., Barber L.G., Freeman L., Griessmayr P.C., Milbury P.E. & Blumberg J.B. (2009). Antioxidant Status and Biomarkers of Oxidative Stress in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23 (2) (pp. 311-316).
- Withrow S.F., Paulson J.M. & Lucroy M.D. (2007). Capítulo 15, Miscellaneous treatments for solid tumours. In Withrow S.F. & Vail D.M., *Small Animal Clinical Oncology* (4ª edição). (pp. 279). Missouri, USA: Saunders Elverier Editora.
- Ziekman P.G.P.M., Otter W.D., Tan J.F.V., Teske E., Kirpensteijn J., Koten J. & Jacobs J.J.L. (2013). Intratumoral interleukin-2 therapy can induce regression of non-resectable mastocytoma in dogs. *Anticancer Research*, 33 (pp. 161-166).

Capítulo V - Anexos

Tabela 14: Valor do PON1 dos animais do grupo estudado.

Neoplasia	Idade (Anos)	Gênero	Raça	PON1 (U/ml)	Sobrevida (meses)
Linfoma	17	Fêmea	Indefinida	0,874	2
Linfoma	8	Macho	Rottweiler	0,266	0,5
Linfoma	8	Macho	Indefinida	1,123	
Linfoma	2	Fêmea	Dogue Alemão	0,438	1
Linfoma	7	Macho	Pointer	0,480	0,5
Linfoma	6	Macho	West Highland	0,660	2
Linfoma	7	Macho	Indefinida	1,213	
Linfoma	9	Macho	Indefinida	0,567	
Mastocitoma	10	Fêmea	Indefinida	1,310	
Mastocitoma	8	Macho	Golden Retriever	1,109	
Mastocitoma	8	Macho	Labrador	0,972	2
Mastocitoma	16	Fêmea	Indefinida	0,938	
Mastocitoma	11	Fêmea	Labrador	1,198	
Mastocitoma	2	Fêmea	Boxer	1,126	
Mastocitoma	10	Fêmea	Golden Retriever	1,106	
Mastocitoma	5	Fêmea	Labrador	1,059	
Mastocitoma	6	Macho	Labrador	0,991	2
Mastocitoma	11	Fêmea	Indefinida	1,155	
Mastocitoma	14	Macho	Golden Retriever	1,114	4
Mastocitoma	4	Macho	Boxer	1,101	
Mastocitoma	14	Fêmea	Indefinida	0,594	2,5
Mastocitoma	8	Fêmea	Labrador	1,174	
Mastocitoma	5	Macho	Boxer	1,642	
Mastocitoma	5	Macho	Buldogue Francês	1,417	

Tabela 15: Valor do PON1 dos animais do grupo controle.

Idade (Anos)	Gênero	Raça	PON1 (U/ml)
1	Fêmea	Dogue Alemão	1,198
6	Fêmea	Labrador	1,204
7	Macho	Labrador	1,183
6	Macho	Labrador	1,419
3	Macho	Boxer	1,144
9	Fêmea	Golden Retriever	1,113
12	Macho	Golden Retriever	1,245
2	Macho	Labrador	1,530
15	Fêmea	Indefinida	0,899
10	Macho	Indefinida	1,225
6	Macho	Indefinida	1,353
10	Macho	Labrador	1,350
5	Macho	Rottweiler	0,904
5	Fêmea	Bulldog Francês	0,969
1	Fêmea	Boxer	1,223
3	Macho	Golden Retriever	1,174
10	Fêmea	Indefinida	1,602
7	Macho	Indefinida	1,057
2	Macho	West Highland	1,363
10	Macho	Indefinida	1,007
12	Fêmea	Indefinida	1,231
2	Fêmea	Indefinida	1,111
2	Macho	Boxer	1,139
6	Fêmea	Pointer	1,284

Tabela 16: Hemograma e análises bioquímicas dos doentes oncológicos.

Neoplasia	Idade (Anos)	Género	Raça	Hemograma	Bioquímicas
Linfoma	17	Fêmea	Indefinida	Normal	Ureia 60 (máx 29) e Cloro 133 (máx 120)
Linfoma	8	Macho	Rottweiler	Anemia NN e leucocitose	ALT 111 (máx 100) e FAS 280 (máx 212)
Linfoma	8	Macho	Indefinida	Normal	Glucose 54 (min 74)
Linfoma	2	Fêmea	Dogue Alemão	Anemia HM e leucocitose	ALT 158 (máx 100) e FAS 431 (máx 212)
Linfoma	7	Macho	Pointer	Leucocitose com neutrofilia e monocitose	Ureia 113 (máx 29) e Creatinina 4,9 (máx 1,8)
Linfoma	6	Macho	West Highland	Normal	Normal
Linfoma	7	Macho	Indefinida	Normal	Normal
Linfoma	9	Macho	Indefinida		
Mastocitoma	10	Fêmea	Pit Bull	Linfopenia 4,44 (min 6)	ALT 183 (máx 100)
Mastocitoma	8	Macho	Golden Retriever	Normal	Normal
Mastocitoma	8	Macho	Labrador	Normal	Normal

Tabela 16 (continuação): Hemograma e análises bioquímicas dos doentes oncológicos.

Neoplasia	Idade (Anos)	Género	Raça	Hemograma	Bioquímicas
Mastocitoma	16	Fêmea	Indefinida	Leucocitose com neutrofilia	Normal
Mastocitoma	11	Fêmea	Labrador	Normal	Normal
Mastocitoma	2	Fêmea	Boxer	Normal	Normal
Mastocitoma	10	Fêmea	Golden Retriever	Normal	Normal
Mastocitoma	5	Fêmea	Labrador	Normal	Normal
Mastocitoma	6	Macho	Labrador	Normal	
Mastocitoma	11	Fêmea	Indefinida	Normal	
Mastocitoma	14	Macho	Golden Retriever	Anemia NN	Normal
Mastocitoma	4	Macho	Boxer	Normal	Normal
Mastocitoma	14	Fêmea	Indefinida	Anemia NN e leucocitose	Normal
Mastocitoma	8	Fêmea	Labrador	Normal	Normal
Mastocitoma	5	Macho	Boxer	Normal	Normal
Mastocitoma	5	Macho	Bulldogue Francês	Normal	Normal

Tabela 17: Exames complementares imagiológicos dos doentes oncológicos.

Neoplasia	Idade (Anos)	Género	Raça	Radiografia Torácica	Radiografia Abdominal	Ecografia Abdominal
Linfoma	17	Fêmea	Indefinida			
Linfoma	8	Macho	Rottweiler	Derrame pleural	Hepatomegalia e perda de detalhe	Alterações no baço e fígado
Linfoma	8	Macho	Indefinida	Normal		Normal
Linfoma	2	Fêmea	Dogue Alemão	Normal	Líquido e gás livre	Líquido livre
Linfoma	7	Macho	Pointer	Padrão broncointersticial difuso não estruturado e linfadenopatia traqueobrônquica		Linfonodos abdominais aumentados e alterações no fígado e baço
Linfoma	6	Macho	West Highland			
Linfoma	7	Macho	Indefinida	Normal		
Linfoma	9	Macho	Indefinida			
Mastocitoma	10	Fêmea	Pit Bull	Normal		Alterações no baço
Mastocitoma	8	Macho	Golden Retriever	Normal		
Mastocitoma	8	Macho	Labrador	Normal		

Tabela 17 (continuação): Exames complementares imagiológicos dos doentes oncológicos.

Neoplasia	Idade (Anos)	Género	Raça	Radiografia Torácica	Radiografia Abdominal	Ecografia Abdominal
Mastocitoma	16	Fêmea	Indefinida			Doença renal crónica e alterações no fígado
Mastocitoma	11	Fêmea	Labrador	Normal		Alterações no baço
Mastocitoma	2	Fêmea	Boxer			
Mastocitoma	10	Fêmea	Golden Retriever	Radiopacidade intersticial		Normal
Mastocitoma	5	Fêmea	Labrador	Normal		Normal
Mastocitoma	6	Macho	Labrador	Normal		Alterações nos linfonodos ilíacos, baço e rins
Mastocitoma	11	Fêmea	Indefinida			
Mastocitoma	14	Macho	Golden Retriever	Normal		Normal
Mastocitoma	4	Macho	Boxer	Normal		Normal
Mastocitoma	14	Fêmea	Indefinida	Normal	Hepatomegalia	Normal
Mastocitoma	8	Fêmea	Labrador	Normal		Normal
Mastocitoma	5	Macho	Boxer	Normal		Quisto no rim direito
Mastocitoma	5	Macho	Bulldogue Francês	Normal		Normal

Resumo submetido para o congresso internacional da Sociedade Europeia de Oncologia Veterinária.

Can serum paraoxonase 1 (PON1) be a prognostic factor in canine oncology?

Neoplastic initiation and progression has been related with oxidative stress, since it acts as a genetic lesion agent, increasing mutations and leading to DNA damage, genome instability, cellular proliferation, increased survival and cell migration. Associated with the neoplastic existence, low concentrations of essential antioxidants are observed in the bloodstream. Paraoxonase 1 is a fast negative acute phase protein with antioxidant properties, thereby it is related to several diseases involving oxidative stress.

The present study aimed to determinate the prognosis value of the PON1 variation in canine oncology.

The studied sample consisted in 48 dogs, half of which belonged to the control group and the remaining were oncologic patients: 8 with lymphoma and 16 with mast cell tumour. In these animals we proceeded with the blood collection, after the diagnosis and before the beginning of any treatment. The value of PON1 activity in serum was determined by a spectrophotometric methodology, according to the adapted Tvarijonaviciute *et al* (2012) technique. Statistical analysis was done to compare the PON1 values in the different groups, as well as the survival function.

The results revealed a decrease in PON1 value in the oncologic patients, which was more pronounced in the lymphoma patients. Significant differences were observed in the survival function results between animals with “Higher” and “Lower” PON1 values.

Although there are several prognostic factors in these tumours, the PON1 activity analysis can be beneficial and can help the owners with their decisions concerning the therapeutic approach of their pet.